

LUCIANNA FREITAS OLIVEIRA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *Agaricus brasiliensis* E BACTÉRIA
LÁTICA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE GÊNEROS ISOLADOS
E EM CO-CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2008

*Á Yeshua (Jesus Cristo), Senhor da minha vida,
À mainha, meu mano (lindo!), voinho e voinha,
Ao meu noivo, um presente divino,
Dedico com carinho e esforço.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela referência de Pai: que ama, que cuida, que acolhe, que compreende, que adverte, que é justo, que é fiel e que vive para sempre. Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser vem de Ti, Senhor!

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná e a CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação e confiança.

Ao prof. Dr. Jose Luis Parada, pela co-orientação, contribuições e incentivos.

Ao prof. Dr. Miguel Nosedá e à prof^a. Dr^a. Maria Eugênia pela atenção, orientação e por terem cedido o Laboratório de Bioquímica de Carboidratos da UFPR para execução de parte do experimento. O trabalho não seria o mesmo sem esta parceria (Biotecnologia x Bioquímica). Também à equipe de alunos de pós-graduação e iniciação científica deste laboratório.

Ao professor Luis Cláudio Fernandes pela contribuição e disposição do Laboratório de Fisiologia para execução dos experimentos *in vivo*. Agradeço também a cooperação dos estudantes de doutorado Fabíola, Sandro e Kátia do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biologia Molecular.

Aos professores Dr^a. Adriane B. P. Medeiros, Dr^a. Luciana P. S. Vandenberghe, Dr. Júlio C. Carvalho e Dra. Vanete T. Soccol pelo apoio.

Às Dr.^{as} Herta Dalla'Santa, Rosália Rubel e à Ms. Juliana Gern pela ajuda na execução dos experimentos com camundongos.

Ao aluno de Iniciação Científica Bruno Motta pela dedicação ao trabalho e companhia nos fins de semana (risos). Aos demais alunos IC: Gilberto, Aline, Tábata e Luiz Felipe.

Às amigas e companherismo de Caroline Tiemi Yamaguishi *Skol*, Andréa Arakaki *Japa*, Carolina Caron, Carolina *Chelly-Carioca*, Marisa *Dentinho*, Larissão, Vanessão, Augustus César (*meio baiano, pois, adora uma rede e água de coco*). Ah! Não poderia deixar de agradecer a *Sashimi* (mais conhecida como Sascha Habu) pela

colaboração na execução dos experimentos. Sua contribuição foi de suma importância, seu tempo cedido não foi em vão, eis aqui uma parte do nosso trabalho. Ei, pelo empréstimo do computador também, sem comentários sua iniciativa!

Aos demais amigos do LPB Susan, Flávera, Camila loura, Mobiletti, Marcelo, Jesus, Gessil Cristal, Camila Suarez, Daniel Cubano, Miytio, Luis Gustavo, Cris, Michelle, Liceris *Louraça*, Rafael e Jeff.

E ao Cássio, que por vezes deve ter detestado a mim e a este trabalho, pois sacrificou muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntos, mas sempre incentivou, sempre apoiou e, o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVOS GERAIS	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Câncer	6
3.1.1 Câncer e Caquexia	6
3.1.2 Alterações no Metabolismo da Glicose	7
3.1.3 Alterações no Metabolismo dos Lipídeos	8
3.1.4 Alterações no Metabolismo das Proteínas e dos Hormônios	8
3.2 DISTÚRBIOS CLÍNICOS DO METABOLISMO	10
3.2.1 Hiperlipidemias	10
3.2.2 Hiperglicemia	11
3.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO	12
3.3.1 Sistema Imune Inato e Adaptativo	12
3.3.2 A Importância dos Macrófagos no Sistema Imune	13
3.3.2.1 Metabolismo dos Macrófagos	14
3.4 BASIDIOMICETOS	15
3.4.1 Importância Comercial e Alimentar dos Basidiomicetos	16
3.4.2 Polissacarídeos de Basidiomicetos	19
3.5 <i>Agaricus brasiliensis</i>	20
3.5.1 Estudos Clínicos Sobre Atividade Antitumoral e Imunoestimuladora	21
3.5.2 Estudo Clínico no Tratamento de Hipertensão, Hiperlipidemias e Doenças Hepáticas	24
3.6 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS	25
3.6.1 Benefícios das Bactérias Láticas: Aspectos Nutricionais e da Saúde	27
3.7 POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS LÁTICAS	30
3.7.1 Homopolissacarídeos	31
3.7.2 Heteropolissacarídeos	32
3.7.3 Estudos Clínicos no Tratamento de Câncer, Hipolipidemia e Imunomodulação	32
3.8 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO PARA AS BACTÉRIAS LÁTICAS	35

3.8.1 Fases do Crescimento Bacteriano	36
3.9 <i>Lb. Paracasei</i> E ESTUDOS CLÍNICOS DE SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA	38
3.10 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE EXOPOLISSACARÍDEOS	40
3.11 REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGRO INDÚSTRIAIS	41
3.11.1 Potencial Aplicação dos Resíduos da Soja como Substrato	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 REAGENTES	46
4.1 EQUIPAMENTOS	46
4.3 E MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS	47
4.3.1 Cultivo de <i>Agaricus brasiliensis</i>	48
4.3.2 Bactéria Láctica	49
4.3.2.1 Identificação da Bactéria Ácido-Láctica	49
4.3.2.2 Condições de Crescimento	50
4.3.3 Co-cultivo das Bactéria Láctica e <i>Agaricus brasiliensis</i>	50
4.4 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA	51
4.5 ISOLAMENTO DA BIOMASSA E TRATAMENTO DO SOBRENADANTE DE <i>A. brasiliensis</i> , BAL E CO-CULTIVO	51
4.6 EXTRAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS	52
4.6.1 Precipitação por Etanol	52
4.6.2 Precipitação por TCA Seguida de Etanol	52
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	53
4.7.1 Determinação de Açúcares	53
4.7.2 Quantificação de Proteínas	53
4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS EPSs	53
4.8.1 4.9.3 Hidrólise Ácida Total dos EPSs	53
4.8.2 Métodos Cromatográficos	54
4.8.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Performance (FPLC)	54
4.8.2.2 Cromatografia de Filtração em Gel	54
4.8.2.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de massa (GC-MS)	54
4.8.3 Ressonância Magnética Nuclear	55
4.9 OBSERVAÇÕES MORFO-ESTRUTURAL DOS EPSs PARCIALMENTE PURIFICADOS	55
4.10 ESTUDOS BIOLÓGICOS <i>In Vivo</i>	55
4.10.1 Teste de Atividade Biológica dos EPSs	56
4.10.2 Métodos Analíticos para Experimentos <i>In Vivo</i>	57
4.10.2.1 Determinação do Número de Células Viáveis	57

4.10.2.2 Avaliação da massa Corporal	57
4.10. 3 Manutenção da Linhagem do Sarcoma 180	57
4.10.4 Coleta se Sangue e Parâmetros Bioquímicos	58
4.10.2.5 Avaliação da Inibição das Células Tumorais	59
4.10.2.6 Processamento de Órgãos e Marcação das Células Imunológicas	59
4.10.3 Experimento 1	59
4.10.4 Experimento 2	60
4.10.5 Experimento 3	61
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICA	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA ÁCIDO-LÁTICA	62
5.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS	64
5.2.1 <i>Agaricus brasiliensis</i>	64
5.2.1.1 Produção de Biomassa e Exopolissacarídeo por <i>Agaricus brasiliensis</i>	64
5.2.1.2 Consumo de Substrato e pH durante a fermentação de <i>Agaricus brasiliensis</i>	68
5.2.1.3 Relação Proteína/Carboidrato no EPS de <i>Agaricus brasiliensis</i>	69
5.2.2 <i>Lactobacillus paracasei</i>	70
5.2.2.1 Produção de Biomassa do Cultivo da Bactéria <i>Lb. paracasei</i>	71
5.2.2.2 Produção de EPS pelo <i>Lb. paracasei</i>	74
5.2.2.3 Relação Carboidrato:Proteína no EPS de <i>Lb. paracasei</i>	76
5.2.3 Co-cultivo do <i>Agaricus brasiliensis</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i>	76
5.2.3.1 Produção de Biomassa pelo Co-cultivo	77
5.2.3.2 Produção de EPS pelo Co-cultivo	78
5.2.3.3 Consumo do Glicose e Evolução do pH durante o Co-cultivo	79
5.2.3.4 Relação Carboidrato:Proteína no EPS peoduzido em Co-cultivo	80
5.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EPSs	80
5.3.1 Caracterização Parcial do EPS produzido por <i>A. brasiliensis</i>	81
5.3.2 Caracterização Parcial do EPS produzido por <i>Lb paracasei</i>	91
5.3.3 Caracterização parcial do EPS da Proteína de Soja Hidrolisada	100
5.3.4 Caracterização Parcial do EPS produzido em Co-cultivo (Ag+B7)	108
5.4 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	115
5.4.1 Microscopia Eletrônica do EPS Extraído da Fermentação de <i>A. brasiliensis</i>	116
5.4.2 Microsocpia Eletrônica do EPS Extraído da Fermentação de <i>Lb paracasei</i>	116
4.5.3 Microscopia Eletrônica do EPS extraído da Fermentação em Co-cultivo	117
5.5 ESTUDO BIOLÓGICO <i>In Vivo</i>	117
5.5.1 Experimento 1	118

5.5.1.1 Influência da Alimentação Suplementada com EPS Sobre o Peso Corpóreo dos Camundongos	120
5.5.1.2 Parâmetros Bioquímicos	122
5.5.1.2.1 Influência da Alimentação Suplementada Sobre o Metabolismo da Glicose	123
5.5.1.2.2 Influência da Dieta sobre os Rins e o Fígado das Cobaias	126
5.5.1.2.3 Influência da Alimentação Suplementada Sobre o Metabolismo das Proteínas e frações	128
5.5.1.2.4 Influência da Suplementação com EPS sobre o Metabolismo Lipídico	129
5.5.1.3 Ativação dos Macrófagos Peritoneais	133
5.5.2 Experimentos 2 e 3	138
5.5.2.1 Influência da Administração Oral e Intraperitoneal dos EPSs Sobre o Peso Corpóreo dos Camundongos	138
5.5.2.2 Parâmetros Bioquímicos	139
5.5.2.2.1 Influência da Administração Oral e Intraperitoneal dos EPSs Sobre o Metabolismo da Glicose	142
5.5.2.2.2 Influência da Administração Oral e Intraperitoneal dos EPSs Sobre os Rins e Fígado das Cobaias	143
5.5.2.2.3 Influência da Administração Oral e Intraperitoneal dos EPSs Sobre o Metabolismo das Proteínas Totais e Frações	145
5.5.2.2.4 Influência da Administração Oral e Intraperitoneal dos EPSs Sobre o Metabolismo dos Lipídeos	145
5.5.3 Inibição da Proliferação das Células Tumorais	146
6. CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS	

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– CORRELAÇÃO ENTRE OS COGUMELOS E SEUS EFEITOS TERAPÊUTICOS	18
TABELA 2	– COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA <i>Agaricus brasiliensis</i>	4
TABELA 3	– COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA O CRESCIMENTO DA BACTÉRIA LÁTICA	9
TABELA 4	– GRUPOS E TRATAMENTOS REALIZADOS NOS EXPERIMENTOS “ <i>In Vivo</i> ”	50
TABELA 5	– COMPOSIÇÃO E RESULTADOS DA GALERIA API 50 CHL	7
TABELA 6	– PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EPS POR <i>Agaricus brasiliensis</i> EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	62
TABELA 7	– COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS DE <i>Agaricus brasiliensis</i>	66
TABELA 8	– RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DO EPS B7 EM DIFERENTES FASES MÓVEIS	90
TABELA 9	– COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS B7	96
TABELA 10	– RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA PSH EM DIFERENTES FASES MÓVEIS	99
TABELA 11	– COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS PSH E FRAÇÕES	10
TABELA 12	– COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE TODOS OS EPS ESTUDADOS E FRAÇÕES	2
TABELA 13	– VALORES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SOROLÓGICOS E PLASMÁTICOS DAS COBAIAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA NO PERÍODO DE DOIS MESES	10
TABELA 14	– EFEITO DA DIETA SUPLEMENTADA COM EPS SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DOS CAMUNDONGOS	7
TABELA 15	– PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SOROLÓGICOS E PLASMÁTICOS DAS COBAIAS ADMINISTRADAS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL COM EPS	11
TABELA 16	– VOLUME DO LÍQUIDO ASCÍTICO E NÚMERO DE CÉLULAS	4
		12
		2
		9
		14
		0

TUMORAIS NO PERITÔNIO EM EXPERIMENTO COM SARCOMA 180	14
	7

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	–	CAUSAS COMUNS DAS HIPERLIPIDEMIAS SECUNDÁRIAS	1
QUADRO 2	–	PRINCIPAIS GLICANAS EXTRAÍDAS DE <i>Agaricus brasiliensis</i> : ATIVIDADES E MECANISMOS DE AÇÃO	0 24
QUADRO 3	–	ESPÉCIES BACTERIANAS MAIS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS	26
QUADRO 4	–	BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE EPS	31
QUADRO 5	–	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO PARA BACTÉRIA ÁCIDO-LÁTICA	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES ENERGÉTICAS DURANTE O ESTADO DE BOA NUTRIÇÃO	7
FIGURA 2	– ESQUEMA DO CICLO DE VIDA DOS BASIDIOMICETOS	16
FIGURA 3	– ESQUEMA DA ESTRUTURA DA GLICANA ISOLADA DE <i>Lentinus edodes</i> , DENOMINADA LENTINANA	20
FIGURA 4	– ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UMA GLICANA DE <i>Agaricus brasiliensis</i> (= <i>Agaricus blazei</i>)	22
FIGURA 6	– MICRORGANISMOS QUE FAZEM PARTE DA MICROBIOTA INTESTINAL	28
FIGURA 7	– PADRÃO TÍPICO DO CRESCIMENTO DE UMA CULTURA BACTERIANA	37
FIGURA 8	– ASPECTO DO MICÉLIO DE <i>Agaricus brasiliensis</i> EM PLACA DE PETRI CONTENDO PDA	48
FIGURA 9	– COLÔNIAS DE BACTÉRIA LÁTICA EM PLACA DE PETRI CONTENDO MRS	49
FIGURA 10	– PROCEDIMENTO PARA RETIRADA DO LÍQUIDO ASCÍTICO EM CAMUNDONGOS COMPROMETIDOS COM O SARCOMA 180	58
FIGURA 11	– IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE HIFAS DO MICÉLIO DE <i>Agaricus brasiliensis</i> EM MEIO COM PSH	6
FIGURA 12	– INFLUENCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA NO MEIO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EPS PELO <i>Agaricus brasiliensis</i>	4
FIGURA 13	– DOSAGEM DE GLICOSE E COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE <i>Agaricus brasiliensis</i> EM MEIO SEM E COM PSH	65
FIGURA 14	– RELAÇÃO CARBOIDRATO: PROTEÍNA NO EPS DE <i>Agaricus brasiliensis</i> EM DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO	69
FIGURA 15	– IMAGEM DE MICROSCÓPIA ÓPTICA DA BACTÉRIA LÁTICA (B7) EM AUMENTO DE 100X	70
FIGURA 16	– CRESCIMENTO BACTERIANO E pH DURANTE A FERMENTAÇÃO DE B7 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	71
FIGURA 17	– DOSAGEM DO EPS PRODUZIDO PELA B7 ANTES E APÓS EXTRAÇÃO EM CLADO DE CULTIVO	72
FIGURA 18	– RELAÇÃO CARBOIDRATO: PROTEÍNA PRESENTE NO EPS DA B7	74
FIGURA 19	– IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DO CO-CULTIVO EM AUMENTO DE 100X	75
FIGURA 20	– CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA BIOMASSA BACTERIANA E FÚNGICA	76

	DURANTE O CO-CULTIVO	77
FIGURA 21	– PRODUÇÃO DE EPS PELO CO-CULTIVO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	78
FIGURA 22	– CONSUMO DE SUBSTRATO E PH DURANTE A FERMENTAÇÃO EM CO-CULTIVO	89
FIGURA 23	– RELAÇÃO CARBOIDRATO: PROTEÍNAS DO EPS APÓS DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO	80
FIGURA 24	– PERFIL CROMATOGRÁFICO EM FPLC DE EPS DE <i>Agaricus brasiliensis</i>	81
FIGURA 25	– ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C RMN DO EPS BRUTO AG EXTRAÍDO DA FERMENTAÇÃO SEM E COM PSH	83
FIGURA 26	– FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS DE <i>Agaricus brasiliensis</i>	84
FIGURA 27	– PERFIL DE ELUIÇÃO DO EPS Ag EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B	86
FIGURA 28	– ESPECTRO COMPARATIVO DE ^{13}C -RMN DO EPS Ag E FRAÇÕES	8
FIGURA 29	– DESENHO DE UMA B-GLICANA	89
FIGURA 30	– PERFIL CROMATOGRÁFICO EM FPLC DO EPS DE <i>Lb paracasei</i>	91
FIGURA 31	– ESPECTRO COMPARATIVO DE ^{13}C -RMN DE EXOPOLISSACARÍDEO DE B7 E PSH	93
FIGURA 32	– FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES DE EPS DE <i>Lb paracasei</i>	94
FIGURA 33	– PERFIS DE ELUIÇÃO DO EPS B7 EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B	95
FIGURA 34	– ASPECTO DA COLUNA EM DIFERENTES FASES MÓVEIS APÓS ABSORÇÃO DO EPS B7	96
FIGURA 35	– ESPECTRO COMPARATIVO DE ^{13}C -RMN DO EPS B7 E FRAÇÕES	9
FIGURA 36	– FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA (PSH)	8
FIGURA 37	– ASPECTO DA COLUNA EM DIFERENTES FASES MÓVEIS	10
FIGURA 38	– PERFIS DE ELUIÇÃO DA PSH EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B	2
FIGURA 39	– ESPECTRO COMPARATIVO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES DA PSH E B7	10
FIGURA 40	– PERFIL CROMATOGRÁFICO EM FPLC DE EPS AG+B7	5
FIGURA 41	– ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C -RMN DE EPS AG+B7 COM DEMAIS OS	9

	EPSs	11
		0
FIGURA 42	– FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS AG+B7	11
		1
FIGURA 43	– PERFIS DE ELUIÇÃO DO EPS AG+B7 EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B	11
		2
FIGURA 44	FIGURA 44 – ESPECTRO COMPARATIVO ¹³ C RMN DO EPS AG+B7 E SUAS FRAÇÕES	11
		4
FIGURA 45	– MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DO EPS PRODUZIDO POR <i>A. bresiliensis</i>	11
		5
FIGURA 46	– MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DO EPS PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO DE <i>Lb paracasei</i>	11
		5
FIGURA 47	– MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DO EPS PRODUZIDO EM CO-CULTIVO	11
		6
FIGURA 48	– FLUXOGRAMA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO EM CAMUNDONGOS SADIOS	11
		7
FIGURA 49	– DISPOSIÇÃO DAS FORMAS CONTENDO RAÇÃO NAS GAIOLAS DOS CAMUNDONGOS	11
		8
FIGURA 50	– SOBRAS DE RAÇÃO PELOS GRUPOS AO LONGO DAS OITO SEMANAS DE ALIMENTAÇÃO	11
		8
FIGURA 51	– EFEITO DA DIETA SUPLEMENTADA COM EPS (30mg/kg/d) NA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPÓREA DAS COBAIAS	11
		9
FIGURA 52	– CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE PLASMÁTICA NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS APÓS DOIS MESES DE DIETA SUPLEMENTADA COM EPS	12
		4
FIGURA 53	– PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA DAS COBAIAS ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA DURANTE DOIS MESES	12
		7
FIGURA 54	– CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES	12
		8
FIGURA 55	– DOSAGEM SOROLÓGICA DE COLESTEROL E FRAÇÕES	12

FIGURA 56	–	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELOS MACRÓFAGOS	9 13
FIGURA 57	–	PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PELOS MACRÓFAGOS DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM EPS	2 13
FIGURA 58	–	ÍNDICE DE FAGOCITOSE NOS MACRÓFAGOS DAS COBAIAS SUPLEMENTADOS COM EPS	3 13
FIGURA 59	–	ÍNDICE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS PELOS MACRÓFAGOS DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM EPS	4 13
FIGURA 60	–	ÍNDICE DE ADESÃO PELOS MACRÓFAGOS NOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM EPS	5 13
FIGURA 61	–	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL (300 mg/kg/d) E INTRAPERITONEAL (30 mg/kg/d) DOS EPSs SOBRE O PESO DAS COBAIAS COMPROMETIDAS COM SARCOMA 180	6 13
FIGURA 62	–	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PLASMÁTICA NOS GRUPOS QUE RECEBERAM EPS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL	8 14
FIGURA 63	–	DOSAGENS SÉRICA DE URÉIA, ÁCIDO ÚRICO, CREATININA, TGO E TGP PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA DAS COBAIAS QUE RECEBERAM EPS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL DURANTE UMA SEMANA	2 14
FIGURA 64	–	INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE EPS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL SOBRE O METABOLISMO DAS PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES	3 14
FIGURA 65	–	INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO ORAL E INTRAPERITONEAL DE EPS SOBRE O METABOLISMO DOS LIPÍDEOS	4 14
			6

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
AG	Ácidos graxos
Ag	<i>Agaricus brasiliensis</i> , grupo do <i>A. brasiliensis</i>
Ag+B7 (GAg+B7)	EPS produzido por <i>A. brasiliensis</i> e a bactéria B7 em co-cultivo, grupo do mesmo
BAL	Bactéria ácido-lática
B7	Bactéria ácido-lática em estudo
Carb.	Carboidrato
C	Controle
CEEA	Comitê de Ética em Experimento Animal
CnPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
DCC	Doença cardíaca coronária
DM	Diabetes Melito
D ₂ O	Água deuterada
DO ₆₆₀	Densidade óptica a 660 nm
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EPS	Exopolissacarídeo
IL	Interleucina
IPS	Intrapolissacarídeo
F	Fator de significância
FID	Federação Internacional de Diabetes
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
G.L.	Graus de liberdade
HCl	Ácido clorídrico
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> ou “colesterol bom”

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDO ₆₆₀	Incremento de densidade óptica a 660 nm
INCA	Instituto nacional do Câncer
<i>i.p.</i>	Via intraperitoneal
L	Litro
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> ou “colesterol ruim”
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
M	Molar
MCH	Complexo de histocompatibilidade maior
MDR	Modificador da resposta imune
mg	Miligrama
µm	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
MRS	<i>De Man, Rogosa e Sharp medium</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitroblue tetrazolium
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p.o.</i>	Via oral
ppm	Parte por milhão
Prot	Proteína
p/v	Peso por volume
PBS	Solução salina tamponada com fosfato a 0,01 M, pH 7,5±1
rpm	Rotações por minuto
PSH	Proteína de soja hidrolisada
RMN	Ressonância Nuclear Magnética
ROS	Espécies reativas do oxigênio

S.	Síndrome
S 180	Sarcoma 180
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SFB	Soro fetal bovino
spp.	Espécies
subsp.	Subespécie
TCA	Ácido tricloro acético
TFA	Ácido trifluoro acético
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TU	Trauma
UFC	Unidades formadoras de colônias
USD	United States Dollar
v/v	Volume por volume

RESUMO

As doenças conhecidas como globalizadas estão entre as principais causas de morte da população humana, exemplo, diabetes mellitus e problemas coronários resultantes de hiperlipidemias, seja a causa familiar ou ambiental. Apesar da disponibilidade de um grande número de drogas capazes reduzir os índices glicêmicos e colesterolêmicos, é fundamental a busca por metabólitos que possam atuar de modo preventivo e/ou eficaz. O interesse em elucidar novos compostos secundários com tal atividade tem aumentado na pesquisa acadêmica. Sabe-se que compostos secundários produzidos por fungos são, na sua maioria, uma rica fonte de metabólitos com propriedades bioativas que podem e têm sido utilizados em clínica médica. Este trabalho visou otimizar a produção de EPSs produzidos por *Agaricus brasiliensis* e Bactéria Láctica em fermentação submersa em cultivos isolados, usando a proteína de soja hidrolisada (PSH) como um dos componentes do meio de cultivo, e potencializar sua produção inovando um co-cultivo entre os diferentes gêneros. Diferentes métodos de purificação parcial foram testados durante a extração: a) precipitação com álcool (4°C) e b) tratamento prévio com TCA seguido da precipitação com álcool (4°C). O uso de TCA facilitou a purificação do exopolissacarídeo, reduzindo a quantidade de proteínas contaminantes da soja presentes no meio. A bactéria em estudo foi identificada como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1 usando Galerias API 50 CH AC-1. A caracterização parcial fez uso de RMN e GC-MS, indicando a presença de uma galactomanana para o EPS Ag, e uma β -D-(1 \rightarrow 4)Galp para o EPS de origem vegetal (soja) proveniente do meio de cultivo. Não foi possível caracterizar o EPS produzido pelo *Lb paracasei*, devido à baixa produção deste (~10 % do total de EPS extraído). A imagem de MEV do EPS Ag+B7 revelou estrutura morfológica semelhante às imagens observadas nos EPSs produzidos pelos cultivos isolados do fungo e da bactéria láctica. Quanto ao potencial biológico, observou-se ativação de macrófagos, atividade hipoglicêmica e hipocolesterolêmica em cobaias *Mus musculus*, normais e comprometidas com Sarcoma 180, após administração de EPS via oral (30 mg/kg/d e 300 mg/kg/d) e intraperitoneal (30mg/kg/d).

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*, bactéria ácido-láctica, co-cultivo, atividade biológica, caracterização parcial de exopolissacarídeos.

ABSTRACT

Modern diseases such as diabetes mellitus, hiperlipidemia and hereditary coronary problems are known as the principal causes of death in human population nowadays. Despite the availability of many drugs that are able to decrease the glycemic and cholesterolemic levels, it is fundamental to search for other metabolites that can act in the prevention or/and in the treatment of these diseases. The interest in finding such substances in microorganisms has increased the academic research. It is known that that the majority of secondary compounds produced by fungus are a rich font of compounds with bioactive properties that can be used in medical treatment. This work's intent was to optimize the production of exopolysaccharides (EPS) produced by the isolated cultures of *Agaricus brasiliensis* (Ag), of the lactic acid bacteria (B7), and by the co-culture of the two species in submerged fermentation. The medium composition was supplemented with hydrolyzed soybean protein (HSP) to reinforce the production of EPS. The bacterium studied was identified as *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1 using the biochemical test-kit API 50 CH AC-1. Different methods for partial purification were tested during the extraction: a) precipitation with alcohol (4°C) and b) previous treatment with TCA followed by precipitation with alcohol (4°C). The use of TCA facilitated the purification of the exopolysaccharide and provided a smaller amount of contaminants proteins from the HPS. For the partial characterization of the EPS it was employed RMN and GC-MS analyses, which indicated the presence of galactomannan in the EPS of Ag and β -D-(1 \rightarrow 4)Galp in the EPS of soy from HSP in the broth. It was not possible to characterize the EPS produced by *Lb. paracasei* because of its small production (approximately 10% of the total extracted EPS). The EPS of the co-culture (Ag+B7) was very similar to the EPS produced by the fungus in the isolated culture, but the presence of a ligation in the anomeric region can indicate a different substitution. The image analysis of EPS by MEV revealed the morphologic structure of each polymer. As for the biological activity, it was observed a hipoglycemic and hipocholesterolemic activity in normal mice, *Mus musculus*. The tests were realized with oral supplementation of EPS (consumed for two months in supplemented animal feed containing 30 mg of EPS/kg/d, resulting in the concentration of 300 mg of EPS/kg/week) and also with intraperitoneal administration (in the concentration of 30mg of EPS/kg/d).

Key-words: *Agaricus brasiliensis*, lactic acid bacteria, co-culture, biological activity, partial characterization of exopolysaccharides.

1 INTRODUÇÃO

A maioria das enfermidades globais que acomete milhões de pessoas em todo o mundo é: hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, depressão, déficit cognitivo, ansiedade, infarto agudo, diabetes mellitus, câncer, aterosclerose artrose, doença pulmonar, colecistopatias e osteoporose. O contínuo aumento da prevalência e incidência destas doenças nas últimas décadas tem alertado a medicina para a necessidade de mudanças de hábitos de vida da população com o objetivo de reduzir os fatores de risco como obesidade, alimentação inadequada, inatividade física e, conseqüentemente, reduzir sua ocorrência e/ou complicações.

O câncer tem sido o maior problema de saúde pública nos países desenvolvidos. Uma em cada quatro mortes ocorre em função desta doença (JEMAL *et al.*, 2006). Em 2005, das 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representa 13 % do total. No Brasil, as estimativas para o ano de 2006, segundo dados do INCA, foram de 472.050 casos e a previsão para 2009 é de que haverá 466.730 novos casos (INCA, 2006). Nos Estados Unidos, a quantidade de mortes causadas por câncer fica em segundo, logo após as doenças do coração. No entanto, pode-se ver que essa diferença não é muito grande: em 2004, o câncer era causa de 23,1 % das mortes, enquanto as doenças do coração eram responsáveis por 27,2 % (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Os problemas cardíacos estão, na maioria dos casos, intimamente relacionados à arteriosclerose e ao Diabetes Mellitus (DM). Os distúrbios da DM podem causar complicações que envolvem doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca, sendo que 75 % dos pacientes diabéticos morrem por algum evento cardiovascular (GU, COWIE e HARRIS, 1999; KANNEL, HJORTLAND e CASTELLI, 1974). Em 2003, o Brasil ocupava o oitavo lugar na classificação de países com maior número de diabéticos, com 5,7 milhões de indivíduos. Segundo a FID, em 2007 a prevalência de diabéticos na população brasileira foi de 6 a 8 %. Estima-se que neste mesmo ano, o número de diabéticos no mundo seria de 246 milhões. Nos Estados Unidos, 20,8 milhões de pessoas,

aproximadamente 7,0 % da população, possuem DM. A OMS prevê para 2030 um número de 366.000.000 diabéticos em todo o mundo, um aumento de 109,6 % em relação a 2000, que é menor do que o aumento esperado no Brasil (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2008).

A tendência pelo consumo de novos produtos e a busca por moléculas que sirvam como base para novas drogas de combate ou prevenção às moléstias humanas tem originado grande demanda. Os Exopolissacarídeos (EPSs) produzidos por diversos microrganismos, têm sido relatados em pesquisas científico-acadêmicas, como agentes da imunoestimulação e com potencial capacidade antitumoral, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica (DE VUYST e DEGEEST, 1998). Estes compostos agem nas células do sistema imune, aumentando a resposta humoral, afetando o desenvolvimento de tumores, e o metabolismo de açúcares e lípidos. E podem exercer potencial efeito profilático e/ou curativo.

As medicinas alternativa e natural mostram que os basidiomicetos são promissores na terapia contra diversas enfermidades devido à atividade imunomoduladora (DI LUZIO, 1978; FELIPPE *et al.*, 1988; FELIPPE 1993; SORIMACHI, AKIMOTO e IKEHARA, 2003; TAKKU, KIMURA e OKUDA, 2001). Particularmente, eles já são bastante usados na dieta oriental. *Agaricus brasiliensis* (WASSER *et al.*, 2002) (= *Agaricus blazei* ss. Heinem.), é um fungo conhecido pelas propriedades medicinais, principalmente, antitumoral, antivirais, antitrombótica, hipoglicemiante, hipolipidêmica e antioxidante. Tais atividades estão relacionadas às substâncias presentes no cogumelo e no micélio, como ésteres, ácidos linoleico e oleico, proteínas, enzimas, vitaminas e polissacarídeos (BRUM, 2005; CHEN, SHAO, SU, 2004; CLEARY; GRAHAM; HUSBAND, 1999; DELMANTO *et al.*, 2001; EGUCHI *et al.*, 1999; GUTERREZ *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006; LUIZ *et al.*, 2003; MATSUI *et al.*, 2003; SHU *et al.*, 2003; STAMETS, 1997; WASSER; WEIS, 1999;). Dentre os exopolissacarídeos produzidos pelo *A. brasiliensis*, os mais conhecidos são as β -D-glicanas, heteropolissacarídeos e as glicoproteínas como o complexo (1 \rightarrow 6)- β -D-glicana-proteína (presente na fração insolúvel em água) e (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicana (presente na fração solúvel em água), sendo esta

responsável por 96,77 % de ação inibitória do crescimento de alguns tipos de tumores (MIZUNO *et al.*, 1990a, 1990b).

As bactérias lácticas também são capazes de produzir metabólitos bioativos considerados seguros como alguns ácidos, bacteriocinas e até mesmo polissacarídeos. Algumas bactérias ácido-láticas, tais como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* estão dentre os principais microrganismos produtores de polissacarídeos com efeitos benéficos para a saúde. Podem ser usadas como imunoadjuvantes aumentando a resposta imune humoral (PERDIGON *et al.* 1986; MATSUZAKI e CHIN, 2000; TAKAGI *et al.* 2001), promover melhoria da microflora intestinal (WELMAN E MADDUX, 2003; LOOIJESTEIJN *et al.* 1999), além do uso “dietético” contra o câncer e distúrbios metabólicos (FERNANDES e SHAHANI, 1990; FULLER, 1989; HATCHER e LAMBRECHT, 1993; MOROTOMI, 1996; OUWEHAND *et al.* 2002; ROLFE, 2000). Os polissacarídeos produzidos pelas bactérias ácido-láticas são considerados polímeros de cadeias longas compostas de unidades repetidas de monômeros de D-galactose, D-glucose e L-ramnose, com ou sem ramificações α e β (DE VUYST e DEGEEST, 1999). Existem dois grandes grupos de EPSs produzidos pelas bactérias ácido-láticas: a) α -glicanas, principalmente compostas por (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 3)-ligada a resíduos de glicose, b) frutanas, compostas principalmente de β -(2 \rightarrow 6)-ligadas a frutose.

De um modo geral, os substratos para o crescimento de fungos são similares aos das bactérias. A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Os resíduos de origem agro-industrial são substratos bastante difundidos neste processo, tais como: polpa de café, farelo de cereais, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (GUTIERREZ-ROJAS *et al.*, 1992; Soccol e vanderberg, 2003). O farelo de proteína de soja, obtido após a extração do óleo dos grãos da soja, constitui-se num resíduo industrial que, muitas vezes, não é aproveitado por empresas. No entanto, ele pode ser utilizado como um substrato economicamente viável em processos biotecnológicos, diminuindo assim o impacto ambiental causado pelo descarte desses resíduos.

Visto que, ainda não existem relatos de cunho científico, sobre trabalhos envolvendo o cultivo simultâneo de *Agaricus brasiliensis* e bactéria lática com o intuito de avaliar o efeito potencializado ou a obtenção de um novo produto resultante do co-cultivo, este trabalho propõe-se: beneficiar a produção de polissacarídeo em fermentação submersa de gêneros isolados e em co-cultivo dispondo-se de um recurso natural que é a proteína de soja hidrolisada; otimizar a purificação parcial dos EPSs durante o processo de extração; caracterizar os biopolímeros fazendo-se uso de cromatografia de exclusão, análise monossacarídica e ^{13}C -RMN e verificar sua atividade biológica *in vivo*.

2 OBJETIVOS

1.2 OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial efeito biológico dos EPSs parcialmente purificados produzidos em co-cultivo por *A. brasiliensis* e bactéria láctica em fermentação submersa, por via oral e intraperitoneal em camundongos normais e comprometidos com sarcoma 180.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar a produção de EPSs utilizando a proteína de soja hidrolisada (PSH) como substrato do meio de cultivo.
- ✓ Testar duas técnicas de purificação parcial durante a extração: a) precipitação com álcool; b) tratamento prévio com TCA seguido da precipitação com álcool.
- ✓ Caracterizar parcialmente os EPSs, por métodos cromatográficos e ^{13}C -RMN.
- ✓ Avaliar respostas imunomoduladora, antitumoral e parâmetros bioquímicos frente ao consumo e à injeção intraperitoneal dos EPSs em cobaias normais e comprometidas com sarcoma 180.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 CÂNCER

O câncer é caracterizado pelo crescimento autônomo, excessivo e desordenado das células que ao alcançarem certa massa, comprimem, invadem e destroem os tecidos vizinhos. Este processo é resultado de uma série de alterações nos genes que controlam o crescimento e o comportamento celular. O desenvolvimento tumoral é um processo complexo que envolve múltiplos estágios: iniciação, promoção, progressão e disseminação. Cada etapa pode ser influenciada por fatores ambientais, que atuam como ativadores ou inibidores do processo. A etiologia do câncer ainda não está bem estabelecida, sendo que não se conhece a(s) causa(s) de 85 a 90 % dos cânceres humanos. Vale ressaltar que diversos fatores ambientais também estão envolvidos na cariogênese, sendo os principais deles o fumo, estresse, infecções e carcinógenos presentes na dieta alimentar (ALBERTS *et al.*, 1997; CURI *et al.*, 2002).

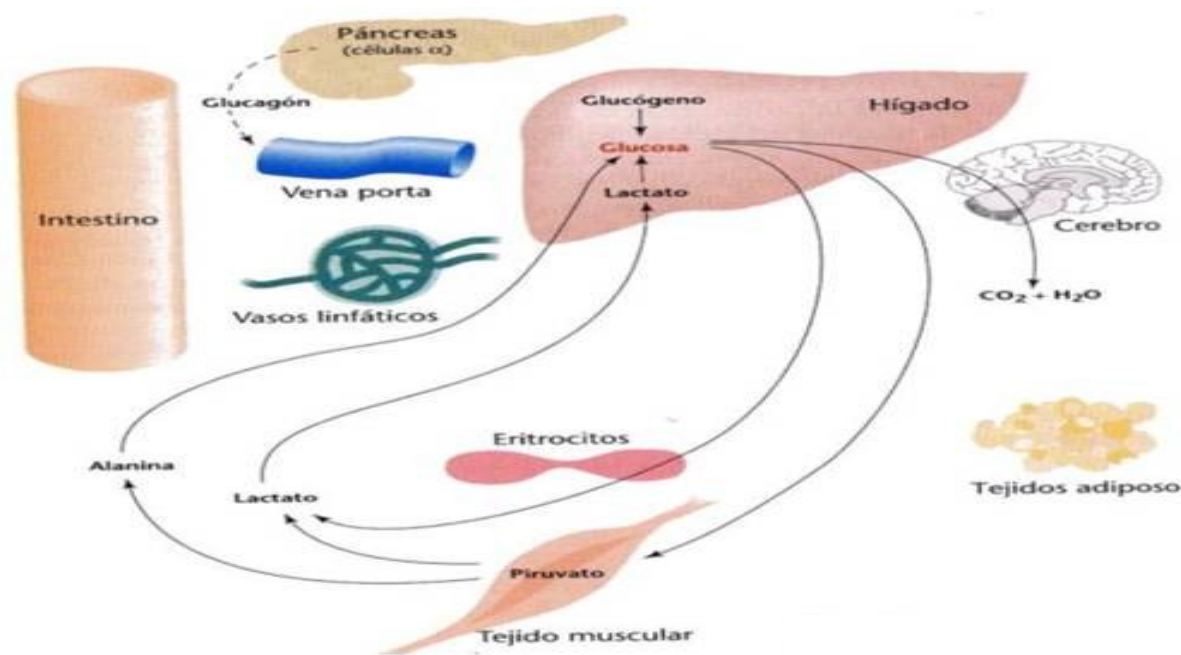
3.1.1 Câncer e Caquexia

Pacientes com câncer frequentemente exibem a síndrome da caquexia (do grego *kakos* = ruim, mal; *hexis* = condição), cujas características são: progressiva perda de peso, anorexia, anemia, disfunção imunitária, intenso catabolismo dos depósitos de carboidratos, gorduras e proteínas. Isto está associado com a redução do tempo de sobrevida e má qualidade de vida do paciente. Dependendo do tipo de câncer, a caquexia está associada com a morte de aproximadamente 20 a 70 % dos pacientes (BARBER, 2001; TISDALE, 1997). De fato, alguns pacientes parecem morrer muito mais pelo alto catabolismo periférico do que pelo resultado do desenvolvimento do tumor em algum órgão vital (DEWYS, *et al.*, 1980; OVESON, HANNIBAL e MORTENSEN, 1993; WARREN, 1935 citado por BONATTO, 2003; TISDALE, 2002).

Segundo Nitenberg e Raynard (2000), a caquexia deve ser vista como o resultado de eventos multifatoriais que podem ser agrupados em três categorias

principais: alimentação inadequada, alterações metabólicas e respostas específicas humorais e inflamatórias. As alterações metabólicas na caquexia neoplásica diferem das observadas no jejum prolongado, pois não são revestidas com dietas adequadas e afetam praticamente todas as vias metabólicas. As alterações no metabolismo dos carboidratos são manifestadas nos pacientes com câncer através da intolerância à glicose que ocorre antes da perda de peso e resistência à ação da insulina pelos tecidos proliferativos. O aumento no “turnover” da glicose em alguns pacientes com câncer ocorre, em grande parte, devido a maior atividade do Ciclo de Cori (TISDALE, 1997) e comprometendo todas as fontes energéticas conferidas durante o estado de boa nutrição de um indivíduo (Figura 1).

FIGURA 1 - UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES ENERGÉTICAS DURANTE O ESTADO DE BOA NUTRIÇÃO



FONTE: Bioquímica Anterior, 2008

3.1.2 Alteração no Metabolismo da Glicose

Muitas alterações no metabolismo dos nutrientes são descritas em pacientes com câncer. A maioria dos tumores produz grandes quantidades de lactato, que é convertido em glicose no fígado, um processo conhecido como o Ciclo de Cori (INUI,

2002). Aumentos de até 40 % na produção da glicose hepática têm sido relatados durante a perda de peso, principalmente, em pacientes com câncer, consequência das alterações metabólicas pela demanda do tumor, contribuindo para o processo de caquexia (TISDALE, 1997 e 2002).

3.1.3 Alteração no Metabolismo dos Lipídeos

O metabolismo dos lipídeos encontra-se alterado resultando em depleção das reservas de gordura e níveis elevados de lipídeos circulantes, glicerol e AG livres, produzidos pela hidrólise de triacilglicerídeos. A hiperlipidemia pode ocorrer também pela diminuição da lipase protéica. Alguns estudos sugerem a produção de substâncias lipolíticas capazes de induzir a lipólise e aumentarem a oxidação de AG (GUIMARÃES *et al.*, 2002). Em experimentos com animais e humanos comprometidos com câncer, foi identificada uma substância denominada fator mobilizador de lipídeos (LMF – *Lipid-mobilizing factor*). Este fator atuaria diretamente nos adipócitos para estimular a lipólise, - efeito diferente do produzido pelas citocinas, pois, estas aumentam a lipólise pela inibição da lipase protéica (DUNLOP e CAMPBELL, 2000; TISDALE, 2001 citados por BONATTO, 2003).

3.1.4 Alteração no Metabolismo das Proteínas e dos Hormônios

Durante a fome, a utilização da glicose pelo cérebro é normalmente substituída por corpos cetônicos derivados da gordura, levando à diminuição da gliconeogenesis de aminoácidos pelo fígado (TISDALE, 2001). No câncer, os aminoácidos, também não são poupados e há empobrecimento da massa corporal magra, níveis reduzidos de síntese protéica e aumento da taxa da degradação de proteína que foram observados em biópsias de músculo esquelético, isto pode ser responsável pela redução do tempo de sobrevivência dos pacientes (TISDALE, 2001). Quanto às alterações das concentrações hormonais neuroendócrinas, a secreção normal ou anormal da insulina já foi descrita em vários trabalhos (CERSOSIMO *et al.*, 1991; FERNANDES *et al.*, 1990). Hormônios contra-reguladores tais como glucagon e cortisol também têm suas concentrações elevadas (BURT *et al.*, 1983; FERNANDES *et al.*, 1991; KNAPP *et al.*,

1991). A infusão de cortisol, glucagon e adrenalina em humanos produzem sintomas de resposta de fase aguda, que incluem gasto energético elevado, balanço de nitrogênio negativo, produção de proteína C reativa e intolerância à glicose (BESSEY et al, 1984; WATTERS et al, 1986).

O tratamento ideal para indivíduos com os sintomas de caquexia seria a ingestão de suplemento nutricional. Contudo, os resultados usados na suplementação enteral ou parenteral, é desapontante, observando somente ganho de peso limitado, principalmente de água e gordura (NIXON *et al.*, 1981, citado por BONATTO, 2003). Acredita-se que há bloqueio no ganho de peso, talvez pelas mudanças metabólicas já descritas. Por isso, vários outros agentes também têm sido utilizados, tais como anti-serotoninérgicos (ciproheptadina), o agente pró-cinético metaclopramida, o corticosteróide dexametasona, progestágenos acetato de megestrol e acetato de medroxi-progesterona, inibidor de gliconeogênese sulfato de hidrazina e a inulina, mas nenhum atendeu às expectativas (AZIZ, 2002; FERNANDES *et al.*, 1991; GEBBIA *et al.*, 1996; KREIENBERG, 2003; MILNER, 2002; SIMON *et al.* 1996 citados por BONATTO, 2003).

O tratamento das neoplasias envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapia, cujos efeitos colaterais debilitam muito o paciente em tratamento. A maioria das drogas usadas é considerada citotóxica e limita-se a atuar em fases específicas do ciclo celular, por esta razão apenas exercem sua atividade contra as células em divisão. Porém, a medicina alternativa faz uso de substâncias moduladoras da resposta imune (MDR) como as β -glicanas que, associados à quimioterapia, acabam aumentando o tempo de sobrevida de pacientes comprometidos (CALABRESI e CHABNER, 1998). Os EPSs produzidos por diversos microrganismos, são relatados como agentes imunoestimantes e com potencial capacidade antitumoral agindo nas células do sistema imune, aumentando a resposta humoral e inibindo o desenvolvimento de tumores (DE VUYST e DEGEEST, 1998), aumentando o tempo de sobrevida dos indivíduos conviventes com o problema.

2.2 DISTÚRIOS CLÍNICOS DO METABOLISMO

3.2.1 Hiperlipidemias

Na prática médica os distúrbios das lipoproteínas são alguns dos mais comuns encontrados dentre as doenças metabólicas. Eles podem estar presentes com suas várias seqüelas que incluem: pancreatite aguda, incapacidade de desenvolvimento e fraqueza, além de cataratas. Atualmente não há nenhuma classificação completa satisfatória para as causas das hiperlipidemias, já se tentou uma classificação, mas elas estão tornando-se cada vez mais complexas à medida que novas mutações vêm aparecendo.

Dentre as causas da hiperlipidemias primárias citadas por Gaw *et al.* (2001) estão, a hipercolesterolemia familiar, hipertriglicidemia familiar, hiperlipidemia combinada familiar, deficiência de lipoproteína lipase, deficiência de Apo-C II, Abetalipoproteinemia (incapacidade de sintetizar ApoB) e Analfalipoproteinemia ou doença de Tangier (incapacidade de sintetizar apoA). Já as causas mais comuns para as hiperlipidemias secundárias estão citadas no Quadro 1. O distúrbio de lipídeos mais comum ligado com a aterogênese e um maior risco de doença coronária (DC) é o nível elevado de colesterol LDL, porém cada vez mais se reconhece que indivíduos com baixo colesterol HDL e hipergliceridemia também estão sob risco aumentado.

QUADRO 1- CAUSAS COMUNS DAS HIPERLIPIDEMIAS SECUNDÁRIAS

DOENÇA	DISTÚRBIO USUAL
Diabetes Melito	Aumento de triglicerídeos
Excesso de álcool	Aumento de triglicerídeos
Insuficiência renal crônica	Aumento de triglicerídeos
Drogas, p. ex., diuréticos de tiazida, bloqueadores β não-seletivos	Aumento de triglicerídeos
Hipotireoidismo	Aumento de colesterol
Síndrome nefrótica	Aumento de colesterol

FONTE: Gaw et al, 2001.

A primeira linha de controle de qualquer hiperlipidemia primária deve ser a modificação da dieta. Isso pode consumir muito tempo e ser difícil para a maioria dos pacientes, mas sua importância não pode ser subestimada. Como alternativa, substâncias capazes de reduzir os níveis das lipoproteínas no sangue estão em ampla disseminação. Dentre as drogas mais comuns estão os inibidores da HMG CoA redutase, que inibe a biossíntese de colesterol e abaixam o colesterol total e da LDL; os fibrilatos, que ativam a lipoproteína lipase e abaixam os triglicerídeos e podem aumentar HDL; as resinas que seqüestram os ácidos biliares que bloqueiam a reabsorção dos ácidos biliares e abaixam o colesterol total e o colesterol LDL (GAW *et al.*, 2001).

3.2.2 Hiperglicemia

A glicose é a moeda comum de carboidratos do corpo. Os carboidratos da dieta são digeridos a monossacarídeos simples e absorvidos no trato gastrointestinal. O amido supre a glicose diretamente, enquanto a frutose e a galactose (da sacarose e da lactose da dieta, respectivamente) são absorvidas e também convertidas em glicose no fígado.

O DM é o distúrbio endócrino mais comum encontrado na prática médica e um dos males que mais acomete a humanidade. Ele pode ser definido como uma síndrome caracterizada pela hiperglicemia devido a uma falta absoluta ou relativa de insulina e/ou resistência à insulina. Geralmente subclassificado em diabetes melito dependente de insulina (conseqüência da destruição auto-imune das células beta que produzem o hormônio) ou não dependente de insulina (resultado de doença pancreática, endócrina, terapia medicamentosa, e raramente, anormalidades nos receptores do hormônio insulina) (GAW *et al.*, 2001). As seqüelas e fatores associados ao diabetes descompensado pode-se citar: a neuropatia, retinopatia, nefropatia, hiperlipidemia, problemas cardíacos, aterosclerose acelerada ou macroangiopatia, hipertensão e cetoacidose.

Aproximadamente 60 % dos diabéticos morrem de doença vascular, e 35 % de causas coronárias cardíaca. No diabético a cegueira é 25 vezes mais comum, e a insuficiência renal crônica, 17 vezes. Existem evidências de que um controle

glicêmico rigoroso retarda o início dessas seqüelas e esta é a única maneira de compensar o DM (GAW *et al.*, 2001).

3.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

3.3.1 Sistema Imune Inato e Adaptativo

O equilíbrio do sistema imunológico é fundamental para preservação da saúde. Ele é dividido em dois grandes conjuntos que atuam em consonância: o sistema imune inato que age inesepecificamente e o sistema imune adaptativo que tem atividade específica. Estas reações imunoesspecíficas são classificadas em imunidade humoral quando mediadas por anticorpos e imunidade celular mediada por linfócitos T.

A primeira linha de defesa do hospedeiro é através do sistema imune inato que se caracteriza em grande parte, mas não totalmente, pela liberação de mediadores inflamatórios como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos. Estas reações não apresentam especificidade e inicia a defesa do organismo agredido através de propriedades fagocíticas. Já o sistema imune adaptativo é estimulado pela exposição do hospedeiro a substâncias estranhas, defendendo-se como uma resposta imune específica e diversificada, de memória a estes agentes agressores. Esta memória tem uma limitação calculada e é capaz de discriminar o próprio do não próprio, reconhecendo uma célula ou uma partícula que não faz parte do organismo. Estas duas linhas de defesa agem harmonicamente, se entrelaçando, por meio de um jogo de moléculas receptoras, estimuladoras e inibidoras; uma estimulando a outra, na tentativa de destruir o patógeno agressor. Como exemplo, a capacidades das células NK em destruir vírus e células estranhas, cujo comportamento genético foi modificado e apresenta uma proliferação descontrolada como ocorre no câncer (GENNARI, 2006).

O equilíbrio do sistema imunológico é fundamental para a preservação da saúde e, qualquer que seja hoje a especialidade biomédica, não pode prescindir dos cuidados deste equilíbrio e sua conseqüente luta na manutenção da hígidez do corpo humano.

3.3.2 A Importância dos Macrófagos no Sistema Imune

Os macrófagos são extensamente distribuídos pelo corpo, mostrando grande variedade estrutural e heterogeneidade funcional. Os macrófagos caracterizam-se por serem células grandes, com forma e núcleo irregular, complexo de Golgi bem desenvolvido, número variável de vesículas de endocitose e grande número de mitocôndrias (AUGER e ROSS, 1992, CALDER, 1998, JANEWAY *et al.*, 2000). Eles expressam grande quantidade de receptores de superfície, envolvidos nas interações desta célula com o ambiente e com o controle da sua atividade (crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, endocitose e secreção). Além de desempenharem papel importante no controle do desenvolvimento tumoral. Na vigência de tumores, o macrófago pode exercer seu papel tumoricida de três maneiras:

- a) Pela inibição da divisão celular, através da liberação de diferentes mediadores (mecanismo independente de contato celular);
- b) De maneira mediada, dependente de contato, envolvendo a produção de TNF e espécies reativas do oxigênio (ROS), como radical superóxido e peróxido de hidrogênio (KLIMP *et al.*, 2002);
- c) Através de mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (TASHIRO, 1998).

A atividade do macrófago infiltrado na massa tumoral pode ser regulada por substâncias liberadas pelo tumor, capazes de reprimir a resposta desta célula. Outros estudos demonstram efeito facilitador do macrófago no desenvolvimento de certos tumores sólidos, através da liberação de fatores que favorecem a angiogênese, permitindo maior aporte de nutrientes e oxigênio para o tecido tumoral (YOUNG *et al.*, 1998; KLIMP *et al.*, 2002). Os macrófagos são capazes de promover a angiogênese pela secreção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular; secreção de fatores de crescimento β (TGF- β – transforming grow factor, PDGF – Platelet-derived growth factor, VEGF – Vascular endothelial grow factor and TNF- α) (LEEK *et al.*, 1996). Contudo os macrófagos associados aos tumores também liberam substâncias como: interferons, angiostatina, fator plaquetário 4 e

trombospondina, que inibem a angiogênese por inibir a proliferação de células endoteliais (SUNDERKOTTER, 1994).

3.3.2.1 Metabolismo dos Macrófagos

Apesar das diferentes funções exercidas por macrófagos e linfócitos na resposta imunitária, estas células possuem padrões metabólicos semelhantes, características das células em divisão rápida, como por exemplo, enterócitos e células tumorais. Embora não tenha capacidade de proliferar-se, o macrófago é capaz, quando ativado e exercendo o seu papel pinocítico, de recompor toda a sua membrana celular em 30 minutos (SHERR, 1990). Em estado quiescente, os macrófagos residentes apresentam taxas metabólicas muito baixas, realizando parcialmente a glutaminólise e a glicólise (ARDAWI e NEWSHOLME, 1983). A partir da ativação dessas células, várias modificações metabólicas acontecem a fim de possibilitar a proliferação dos linfócitos e aumento da síntese de diferentes substâncias envolvidas na resposta imunitária, incluindo citocinas (CALDER, 1998).

4.2 BASIDIOMICETOS

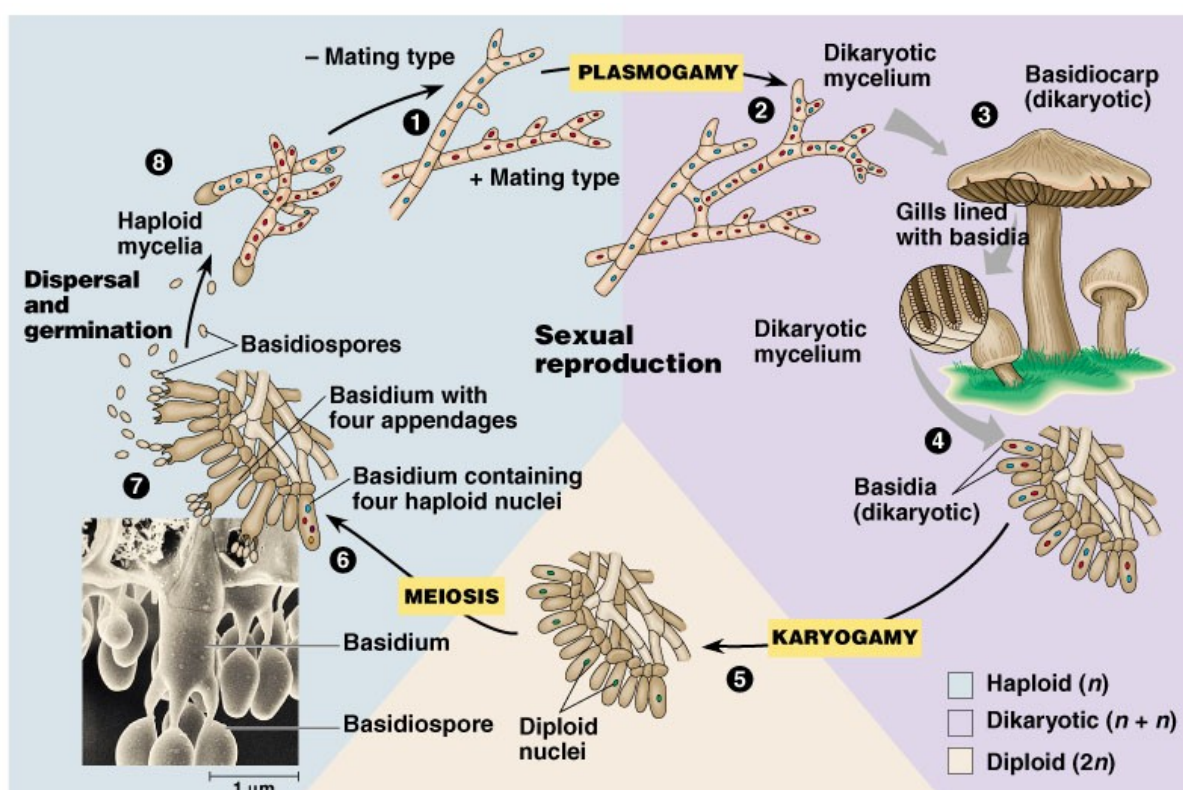
O reino dos fungos é um grupo bastante heterogêneo, sendo que os seus representantes são encontrados em todos os ambientes. Eles são conhecidos popularmente como bolores, mofos, cogumelos comestíveis e alucinógenos. São seres eucarióticos, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, formando um micélio verdadeiro (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Os fungos são os agentes mais importantes de degradação na Terra, visto que degradam celulose e lignina com alta eficiência. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é, em grande parte, controlada por esses decompositores, que determinam a taxa de nutrientes liberados e devolvidos para o meio (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Esse reino é dividido em grupos menores, sendo que o filo Basidiomycota agrupa os seus representantes mais desenvolvidos.

Os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, comumente conhecidos como basidiomicetos, constituem um grupo bastante diverso, sendo os cogumelos e orelhas-de-pau, as formas mais conhecidas. Eles apresentam, em sua maioria, uma frutificação macroscópica, constituída por hifas modificadas que formam pseudotecidos, os quais se diferenciam em píleo, estipe, lamelas, anel e volva (PUTZKE e PUTZKE, 1998) são os basidiomas ou corpo de frutificação. O pseudotecido desses seres vivos é conhecido como micélio, o qual consiste de hifas septadas, bem desenvolvidas e microscópicas, mas que podem ser facilmente observadas quando formam a massa micelial. Há três tipos de micélio: primário, secundário e terciário (Figura 2). O primeiro caracteriza-se pela germinação dos esporos, formando hifas haplóides. O crescimento e encontro dessas hifas geram uma hifa com dois núcleos separados, caracterizando o micélio secundário. Inicia-se então um crescimento ordenado para formação do sistema reprodutor, basidiocarpo, o qual ainda apresenta estruturas estéreis. Neste estágio, o micélio, já denominado terciário, inicia a formação de basídios, onde ocorre a cariogamia, formando um único núcleo diplóide. Este núcleo sofre meiose gerando 4 núcleos haplóides, os quais migram até o ápice de estruturas conhecidas como esterigmas para formar os esporos e recomeçar o ciclo (PUTZKE e PUTZKE, 1998).

O número de espécies de cogumelos existentes, deduzido pelo *Dictionary of the Fungi*, totaliza pelo menos 14.000, sendo que esse valor pode ser superior considerando que muitas espécies ainda não foram descritas. Além disso, espécimes semelhantes morfológicamente estão reunidos em um mesmo grupo, quando deveriam estar classificados como espécies biológicas diferentes. Estudos de compatibilidade e seqüências moleculares entre esses fungos mostram que uma única “espécie” pode agrupar 20 espécies distintas (WASSER, 2002). A partir desses estudos, estima-se que existam 140.000 espécies de cogumelos no mundo, das quais apenas 10 % foram classificadas. Em relação a esse percentual, cerca de 2.000 espécies são comestíveis e 700 são conhecidas por possuírem significativas propriedades farmacológicas, tais como atividade antitumoral, antiinflamatória, antiviral, ativadora do sistema imune, hipoglicemiante, hipolipidêmica, antioxidante, estimulantes, entre outras (WASSER e

WEIS, 1999). Esses dados apontam o potencial apresentado pelos basidiomicetos tanto para fins alimentícios quanto terapêuticos, sendo que ainda há um vasto campo a ser estudado.

FIGURA 2 – ESQUEMA DO CICLO DE VIDA DOS BASIDIOMICETOS



FONTE: Ciclo de Vida..., 2008.

3.4.1 Importância Comercial e Alimentar dos Basidiomicetos

A importância atribuída a esse grupo está relacionada à utilização de seus representantes na alimentação e medicina popular desde tempos remotos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; WASSER, 2002). No entanto, alguns espécimes são considerados venenosos, fator que impediu, por vários anos, o consumo de cogumelos em geral por populações com menor conhecimento sobre fungos comestíveis (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). A familiarização com o consumo de basidiomicetos tornou-se evidente quando se iniciou o cultivo de espécies como *Lentinus edodes* (= *Lentinula edodes*) e *Volvariella volvacea* na China. Desde então, houve um crescimento no consumo dessas iguarias e,

conseqüentemente iniciou-se a produção comercial em países da Europa e nos Estados Unidos (ANKE, 1997). Japão, Taiwan e Coréia são grandes produtores de cogumelos, entretanto, a China lidera a produção, exportação e consumo desde 1978. As espécies mais cultivadas são: *Agaricus bisporus* (Champignon), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Pleurotus* spp. (Shimeji), *Auricularia* spp., *Tremella* spp. e *Flammulina velutipes* (Enoki) (CHANG, 2005). A espécie mais produzida nos Estados Unidos, Austrália e em alguns países da Europa e Ásia é o *Agaricus bisporus* (ANKE, 1997), possuindo a tecnologia de cultivo mais avançada, que mantém locais com temperatura, umidade e ventilação controlados (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). O *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei*), popularmente conhecido como cogumelo-do-sol, é nativo do Brasil e foi exportado para o Japão pela primeira vez em 1965. Desde então, esse basidiomiceto tem sido cultivado em larga escala neste país e na Indonésia (MIZUNO *et al.*, 1990a).

Estudos comprovam que o valor nutritivo dos cogumelos, apesar da variabilidade apresentada entre as espécies estudadas, é considerado de qualidade para uma dieta balanceada (MANZI *et al.*, 1999). Altos teores de proteínas e fibras, em conjunto com baixas taxas de lipídios tornam os cogumelos alimentos saudáveis, podendo ser consumidos mesmo em dietas restritas, como para obesos ou pessoas com hipercolesterolemia. Além disso, a presença de altos teores de potássio, juntamente com baixos níveis de sódio, torna esses alimentos apropriados para pessoas com hipertensão (MANZI *et al.*, 1999; AGRAHAR-MURUGKAR; SUBBULAKSHMI, 2005). Cálcio, ferro, zinco, magnésio e fósforo também foram observados em quantidades significativas em *Agaricus brasiliensis*, *Lentinus edodes* e *Pleurotus* spp. (ÇAGLARIRMAK, 2007).

Mdachi e colaboradores (2004) observaram que de 10 espécies de cogumelos estudados, 5 (*Agaricus* sp., *Boletus pruinatus*, *Lactarius* sp., *Pleurotus sajor-caju* e *Boletinus cavipes*) apresentaram de 2 a 7 aminoácidos essenciais. Vitaminas do complexo B, ácido ascórbico e ácido fólico também já foram observadas em variedades de *L. edodes*, *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* (ÇAGLARIRMAK, 2007). Materiais orgânicos desperdiçados, como subprodutos agrícolas e resíduos animais,

são utilizados como substrato para o cultivo de fungos, produzindo alimentos de boa qualidade, podendo ser consumidos pelos humanos. Dessa maneira, os nutrientes são reciclados e retornam para a cadeia alimentar (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; ANKE, 1997). A tabela abaixo especifica as correlações terapêuticas entre os cogumelos.

TABELA 1: CORRELAÇÃO ENTRE COGUMELOS E SEUS EFEITOS TERAPÊUTICOS

	Ab	Cs	Ff	Fv	Ga	Gf	Gl	Go	He	Io	Le	Ls	Pl	Po	Pu	Sc	Tv
Antibacteriano		•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•
Antifúngico						•					•					•	
Antiinflamatório					•		•		•	•			•		•		
Antioxidante		•															•
Antitumoral	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•		•		•	•	•
Antiviral	•		•		•	•			•	•		•	•	•	•	•	•
Homeostático		•				•	•				•			•			
Hipoglicemiante	•	•				•	•				•						
Sistema cardio-vascular		•					•	•						•			
Hipocolesterolemiantes	•	•		•		•	•				•			•			
Imunomoduladora	•	•		•		•	•	•		•	•				•		•
Regulador do sistema renal	•	•					•				•						•
Longevidade		•					•			•	•				•		•
Sistema respiratório		•			•	•	•	•							•		
Sistema neurológico		•					•	•	•					•			
Potencializador sexual		•									•						
Anti-estresse		•				•	•				•						

Codificação das Espécies de Cogumelos Medicinais

Ab - *Agaricus blazei* (Royal Sun Agaricus)

Pu - *Polyporus umbellatus* (Zhu ling)

Go - *Ganoderma oregonense* (Oregon ganoderma)

Fv - *Flammulina velutipes* (Enoki)

Pl - *Phellinus linteus* (Meshimakobu)

Io - *Inonotus obliquus* (Chaga)

Cs - *Cordyceps sinensis* (Cordyceps)

Sc - *Schizophyllum commune*

Po - *Pleurotus ostreatus* (Oyster)

Ga - *Ganoderma applanatum* (Artist Conk)

Ls - *Laetiporus sulphureus* (Chicken-of-the- Woods or SulphurTult)

(Tukey Tail or Yun Zhi)

Tv - *Trametes vesicolor*

Gl - *Ganoderma lucidum* (Reishi)

Le - *Lentinus edodes* (Shiitake) (Split-gill Polypore or Suehirotake)

Ff - *Fomes fomentarius* (Tinder fungus)

Gf - *Grifola frondosa* (Maitake)

He - *Hericium erinaceus* (Yamabushitake)

Fonte: Stamets, 2001

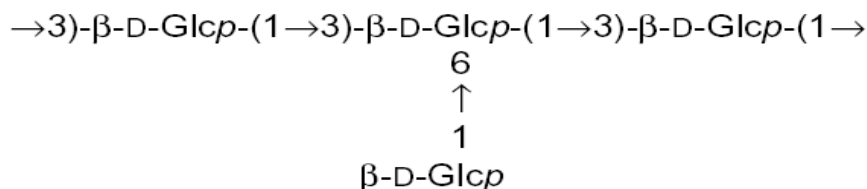
3.4.2 Polissacarídeos de Basidiomicetos

Polissacarídeos são polímeros de média a alta massa molecular, constituídos por monossacarídeos conectados por ligações glicosídicas. Esses polímeros diferenciam-se, principalmente, pelos monômeros constituintes, tipo de ligação, comprimento da cadeia e número de ramificações (FREIMUND *et al.*, 2003). Essas macromoléculas, sintetizadas pelos seres vivos em geral, exercem diversas funções no organismo como: armazenamento de energia (amido e glicogênio), estruturação (celulose, quitina e peptideoglicano), além de atuarem como portadores de informações, servindo como indicadores de endereçamento para algumas proteínas e como mediadores para interações específicas entre as células e/ou matriz extracelular (LEHNINGER e NELSON; COX, 2002).

Diversos polissacarídeos já foram isolados de basidiomicetos, como glicanas, heterogalactanas, heteromananas, entre outras (SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Essas moléculas são divididas em dois grupos: os homopolissacarídeos e os heteropolissacarídeos. Os primeiros são polímeros formados apenas por um tipo de monossacarídeo, enquanto os últimos são formados por mais de um tipo.

Dentre os principais homopolissacarídeos isolados estão as glicanas, que apresentam cadeias principais formadas por unidades de α - e/ou β -Glc_p ligadas (1→3), (1→6) e/ou (1→4). Sendo frequentemente encontradas β -glicanas com cadeias ligadas (1→3), substituídas em O-6 por terminais não-redutores de β -D-Glc_p, diferenciando-se apenas na proporção das substituições (Figuras 3). Essas glicanas já foram descritas para *Agaricus blazei* Murril (WASSER, 2002a, MIZUNO *et al.*, 1999a), *Pleurotus ostreatus* (YOSHIOKA *et al.*, 1985), *Boletus erythropus* (CHAUVEAU *et al.*, 1996), *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatoroseus* (CARBONERO *et al.*, 2006) e *Flammulina velutipes* (SMIDERLE *et al.*, 2006). Também já foram isoladas glicanas lineares do corpo de frutificação de *Armillaria mellea* (FRASER e LINDBERG, 1967), contendo ligações β -(1→3). Diversas outras estruturas similares às citadas já foram isoladas de vários basidiomicetos, sendo que esses polissacarídeos diferenciam-se apenas em relação ao comprimento das cadeias laterais e massa molecular (ZHANG *et al.*, 2007).

FIGURA 3 – ESQUEMA DA ESTRUTURA DA GLICANA ISOLADA DE *Lentinus edodes* DENOMINADA LENTINANA



Um polissacarídeo incomum foi descrito para *Ganoderma resinaceum*, o qual apresentou uma β -glicana com ligações (1 \rightarrow 3), parcialmente substituída em O-6 por cadeias laterais de β -D-Glcp substituídas em O-4 a cada dois resíduos da cadeia principal (AMARAL *et al.*, 2008). Além das glicanas, outros homopolissacarídeos já foram isolados e caracterizados por Rosado e colaboradores (2002) que descreveram para *Pleurotus ostreatoroseus*, um exopolissacarídeo caracterizado como α -manana, com ligações (1 \rightarrow 6) e substituída em O-2, por cadeias laterais de diferentes tamanhos, as quais podem apresentar substituições em O-2 ou O-3. Os mesmos autores também isolaram outro exopolissacarídeo denominado α -galactana (1 \rightarrow 4)-ligada, parcialmente metilada na posição O-3, na proporção de 2:1.

5.2 *Agaricus brasiliensis*

Os representantes do gênero *Agaricus* pertencem à ordem Agaricales, a qual é conhecida pela grande variedade morfológica e por reunir os cogumelos propriamente ditos (LOPES, 1999). O espécime *brasiliensis* (=blazei) do gênero *Agaricus* é conhecido no Brasil como Cogumelo do sol, no Japão como Himematsutake, Agarikusutake ou Kawarihiratake e na China como Ji Song Rong. É amplamente usado e considerado um alimento funcional, bem como terapia natural sob a forma de um medicamento extraído principalmente para a prevenção e tratamento de algumas moléstias como o diabetes, aterosclerose, hepatite, hipercolesterolemia, doenças do coração, dermatites e assim por diante (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008).

Em geral, a composição bruta de cogumelo é água (90 %), proteína (2-40 %), gordura (2-8%), carboidratos (1-55 %), fibra (3-32 %) e de cinzas (8 -10 %) (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008). Metabólitos ativos podem ser isoladas a partir do corpo de frutificação e da cultura pura de micélios. Pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de obter metabólitos ativos através da fermentação submersa, visto que a metodologia reduz custos e tempo.

3.5.1 Estudos Clínicos de Atividade Antitumoral e Imunoestimuladora

Ikegawa e colaboradores (1969) publicaram um dos primeiros relatórios científicos sobre a atividade antitumoral do extrato obtido pela fervura do corpo de frutificação em água de alguns fungos comestíveis pertencentes à família de *Polyporaceae*, revelando atividade contra o Sarcoma 180, enxertados em animais. Este EPS foi identificado por hidrólise ácida como uma β -D-glicanas (WASSER, 2002a). Kawagishi e colaboradores (1989) purificaram compostos anticancerígenos a partir de extrato com hidróxido de sódio do corpo de frutificação do *A. blazei* Murril, detectaram um polissacarídeos com atividade antitumoral e denominaram-no: de FIII-2-b, uma fração que compreendia a um complexo proteína composta de 43,4 % de proteína e 50,2 % de carboidratos e caracterizada com cadeias (1-6)- β -D-glucopiranosil.

Durante a frutificação, nos diferentes estágios de maturidade do fungo, o *A. brasiliensis* é capaz de produzir diferentes compostos que podem conter de α -glicanas a β -glicanas. O rendimento estrutural e a diversidade das glicanas aumentam com a maturação do corpo de frutificação; por isso o tempo da colheita e conservação do corpo de frutificação é de grande importância, para obter o melhor extrato (dados que quase sempre não são relatados em artigos científicos) (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008). Para cultivo submerso de micélio do fungo não é diferente.

As glicanas do *A. brasiliensis* são, de um lado compostas por (1 \rightarrow 6)- β -ligações como às encontradas por Dong, Yao e Yang (2002) e Ohno et al (1986), cujas frações ativas das β -glicanas do *A. brasiliensis* possuem uma razão de 1: 2 para ligações do tipo (1 \rightarrow 6)- β -estrutural e (1-3)- β -ligação. As glicanas lineares (1 \rightarrow 6)- β parecem estar

Um complexo manana-proteína (AB-FP) com traços de glicose, galactose e ribose, cujo peso molecular correspondia a 10^5 - 10^7 Da, foi extraído de uma cultura submersa de *A. blazei* com rendimento de 575 mg/L, também com significativa atividade antitumoral (WASSER, 2002a). Fan (2002) trabalhou com a cepa LPB 03 de *A. brasiliensis* para extrair dois EPSs em fermentação submersa; um solúvel em água e outro insolúvel. O EPS solúvel era um conjugado que continha 5.14% de proteína com peso molecular de 2.09×10^6 Da, e o EPS insolúvel possuía 14.93% proteína. O EPS solúvel mostrou inibição contra o Sarcoma 180 em camundongos, alcançando 72.19 % de inibição comparada com grupo de controle. Além disso, 50% dos camundongos para o grupo teste demonstraram regressão tumoral total (FAN, 2003).

Sendo assim, diferentes tipos de polissacarídeos podem ser isolados tanto do corpo de frutificação, quanto do micélio ou caldo de fermentação de *A. brasiliensis*, por produção intra ou extracelular com estruturas, substâncias químicas e pesos moleculares diferentes (Quadro 2).

QUADRO 2 - PRINCIPAIS GLICANAS EXTRAÍDAS DE *A. brasiliensis*: ATIVIDADES E MECANISMOS DE AÇÃO

Glucanas	Atividades		Mecanismo de Ação	Autores
	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>		
(1→6)-β-glucana-proteína		Anti-tumor Sarcoma 180		Kawagishi <i>et al.</i> (1990); Mizuno <i>et al.</i> (1990b)
(1→6)-(1→3)-β-glucana		Anti-tumor Sarcoma 180		Mizuno <i>et al.</i> (1990a)
(1→6)-β-glucana-proteína		Anti-tumor Meth A	↑ linfócitos T _{aux.} ↓ linfócitos T _{supres.}	Itoh <i>et al.</i> (1994)
(1→4)-α-glucana (1→6)-β-glucana-proteína		Anti-metastase Meth A (intra tumoral)	Imunoestimulação com citotoxicidade seletiva	Ebina <i>et al.</i> (1998)
(1→4)-α-glucana (1→6)-β-glucana-proteína	Tumoricida em células de tumor Meth A	Anti-tumor e anti-metástase Meth A	Citotoxicidade seletiva, ↑ NK e apoptose	Fujimiya <i>et al.</i> (1998)
(1→6)-(1→3)-β-glucana e (1→6)-(1→3)-β-glucana-proteínas		Anti-tumor Sarcoma 180	Imunoestimulação	Ohno <i>et al.</i> (2001)
(1→6)-(1→3)-β-glucana	Proliferação de linfócitos T e B			Dong <i>et al.</i> (2002)

FONTE: Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2007

3.5.2 Estudos clínicos no Tratamento da Hipertensão, Hipercolesterolemia e Doenças Hepáticas

Administração do ácido γ-aminobutírico (GABA) produzido pelo *A. brasiliensis* (AG-GABA) levou a diminuição da hipertensão em seres humanos, num ensaio aberto de dupla ocultação com teste cruzado. Durante o período de ingestão da AG-GABA, a pressão arterial, tanto sistólica como a diastólica, diminuiu para valores estatisticamente significativos, se comparados com os do período da ingestão de placebo. Porém, não houve diferença significativa, nem nos valores de colesterol nem de transaminases hepáticas e γ-GTP (TOSHIRO *et al.*, 2003). Efeitos do complexo proteína-polissacarídeo (A-PBP e L-PBP) extraído de micélios de *A. brasiliensis* sobre colesterol sérico e do peso corporal foi investigada em 90 voluntários do sexo feminino durante 8 semanas: o efeito da redução de peso (11,8 %) E efeitos hipocolesterolemiantes (11,0 %) foram mais significativos, indicando sua ação sinérgica. Estes dados sugerem que o controle de peso e o efeito hipolipidêmico da L-

PBP e A-PBP estão envolvidos, na absorção de colesterol, no seu papel de fibra dietética, bem como no metabolismo do colesterol (KWEON et al, 2003 citado por FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008).

Um outro estudo conduzido por Inuzuka e Yoshida (2002) avaliou os efeitos clínicos e segurança em seres humanos voluntários, com γ -GTP e um extrato líquido de *A. blazei* (Extrato do Cogumelo *Agaricus*; ABCL) no tratamento da hepatite C. Num total de 20 pacientes (50 % de homens), com hepatite crônica tipo C receberam o ABCL por via oral, duas vezes por dia, durante 8 semanas. Foi encontrada atividade em 80 % dos doentes em ambos os sexos, sem quaisquer resultados toxicológicos e outros efeitos colaterais. O estudo deste composto associados aos dados clínicos iniciais são interessantes, porém ainda precoces para estabelecer definitivamente um real benefício a partir do pressuposto de extrato ABM embora não se saiba exatamente quais são as substâncias ativas. Por enquanto, apenas as β -glicanas podem ser consideradas substâncias ativas (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2008).

6.2 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

As bactérias láticas são as bactérias mais importantes presentes em alimentos fermentados (BATTCOCK e AZAM-ALI, 1998). São células vivas, procariontes e heterotróficas, pois necessitam de fontes de carbono relativamente complexas (DELLAGLIO *et al.*, 1994). Pertencem a um grupo de bactérias Gram-positivas, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, na forma de cocos ou bacilos, e que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos. Este grupo é composto de espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium*. São estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém, aerotolerantes, e geralmente são catalase-negativas (CONDON, 1987; DELLAGLIO *et al.*, 1994; SCHLEIFER e LUDWIG, 1995; KLEIN *et al.*, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Contudo, o termo “bactéria lática” por definição, são as bactérias que fermentam açúcares predominantemente a ácido láctico (Figura 5), inclui principalmente os

gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (SCHLEIFER e LUDWIG, 1995).

As bactérias lácticas são amplamente utilizadas como probióticos. O Comitê Internacional define probióticos como “microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinada quantidade, exercem efeitos benéficos à saúde além da nutrição geral inerente” (GUARNER e SCHAAFSMA, 1998; FAO/WHO, 2001). Isto significa que os microrganismos devem estar vivos e presentes em grande quantidade, geralmente acima de um bilhão por dose diária ingerida (GORBACH, 2002). Nas últimas décadas têm aumentado à procura por alimentos probióticos. Um importante critério para que uma bactéria possa ser considerada probiótica é ser tolerante a bile, produzir compostos antimicrobianos que prejudique o desenvolvimento de bactérias patogênicas e colonizar o trato intestinal humano (SAXELIN, 1995) (Quadro 3) .

QUADRO 3 – ESPÉCIES MICROBIANAS MAIS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS

GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	GÊNERO <i>Bifidobacterium</i>	OUTROS GÊNEROS
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>Lb. fermentum</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. lactis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. paracasei</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		

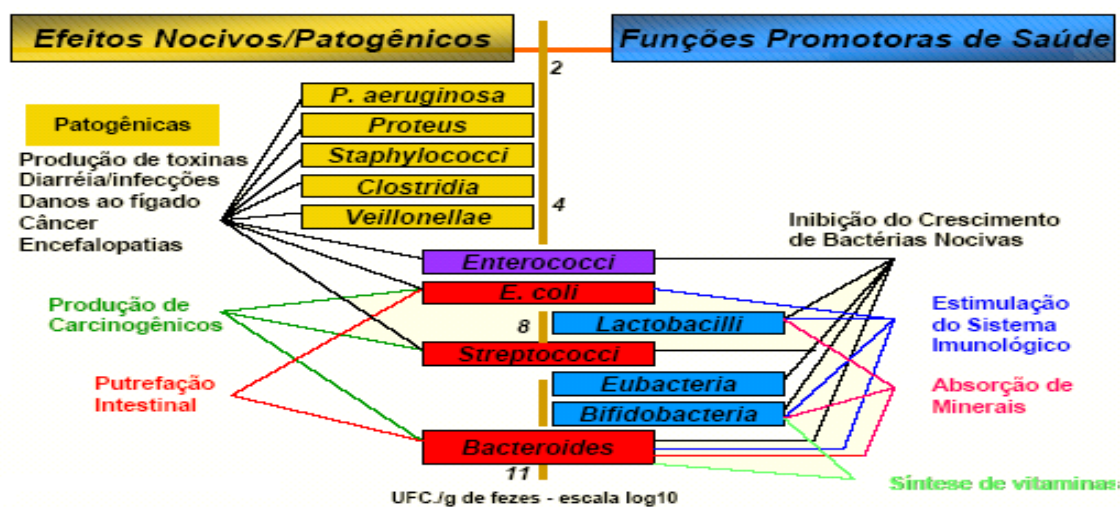
FONTE: Prado, 2007

3.6.1 Benefícios das Bactérias Lácticas: Aspectos Nutricionais e da Saúde

As BALs produzem uma série de metabólitos bioativos que vão desde ácidos orgânicos a outros componentes de baixo peso molecular. Algumas delas liberam bacteriocinas, - substâncias que agem como antibióticos -, ou EPSs que servem para dar viscosidade e compostos aromáticos para conferir odor característico às bebidas fermentadas. Por enquanto, o maior objetivo da comercialização dos microrganismos probióticos é promover o balanço da microflora intestinal, amenizar distúrbios gastrointestinais. Estes produtos são comercialmente bem difundidos, na Europa, - em países como França e Itália -, nos Estados Unidos e em alguns países da Ásia.

A microbiota intestinal pode ser dividida em três grupos (Figura 6). Pertencem ao primeiro grupo os lactobacilos, estreptococos lácticos e as bifidobactérias que colaboram para o bem-estar do homem através mecanismos tais como aumento da resistência à colonização de patógenos, ativação do sistema imunológico, produção de vitaminas, inativação de substâncias cancerígenas e transformação de colesterol ao nível da mucosa intestinal. Ao segundo grupo pertencem as enterobactérias e os enterococos que, embora causem infecções extra-intestinais, frequentemente favorecem o aumento das defesas imunológicas. O terceiro grupo são bactérias nocivas, representadas pelos clostrídeos e bactérias sulforredutoras que produzem toxinas e H_2S tóxico, respectivamente (TRABULSI e CARNEIRO-SAMPAIO, 2000 citados por PRADO, 2007). As bactérias probióticas beneficiam o trato gastrointestinal e propiciam o equilíbrio da microbiota à luz destes órgãos e, por isto, tornaram-se emergentes, com aplicações que vão desde a agroindústria ao uso profilático em humanos: prevenção de diarreias causadas por bactérias e vírus patogênicos; ação contra infecções e complicações provenientes da colonização do *Helicobacter pylori*, causador da gastrite tipo B, úlceras pépticas e câncer gástrico; prevenção de doenças inflamatórias e síndromes do intestino; prevenção de câncer de cólon; ativação do sistema imunológico; prevenção de doenças alérgicas; prevenção e terapia de doenças cardiovasculares diminuição do colesterol e triacilglicerídeos e redução de doenças do trato urogenital (UTI) (FAO/WHO, 2001; FRAGA, SCAVONE e ZUNINO, 2005; HONG, *et al.*, 2004; REID 2001).

FIGURA 6 –MICROORGANISMOS QUE FAZEM PARTE DA MICROBIOTA INTESTINAL



FONTE: Gibson e Collins, 1998.

a) Produção de Ácidos Orgânicos

A produção de ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido láctico, propiônico e ácido acético, são de suma importância na indústria alimentícia (BENTHIN e VILLADSEN 1995; KASHKET 1987). Durante a fermentação das BALs, devido ao acúmulo destes ácidos, há uma redução no pH do fermentado que impede o crescimento de outros microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras), promovendo uma acidificação intracelular e desnaturação de proteínas da parede celular de microrganismos competitivos, conferindo atividade antimicrobiana à cultura. O ácido acético, por ser mais inibidor que o ácido láctico e outros ácidos, torna-se cítrico para o desenvolvimento da *Listeria monocytogenes* (AHMAD e MARTH 1989, RICHARDS *et al.*, 1995), e para a germinação de *Bacillus cereus* (WONG e CHEN, 1988), o que confere uma característica essencial para o termo probiótico. A *Listeria monocytogenes*, é um bastonete Gram positiva, amplamente distribuída na natureza. Frequentemente acomete pacientes com sistema imunológico deprimido, causando-lhes diarreias, em infecções, pode causar que leva a encefalite, meningite, endocardite e abortos. O *Bacillus cereus* tem a forma de bastonete espiralado com esporo termo-resistente, responsável por doenças de origem alimentar, quando se

desenvolve de forma vegetativa produz toxinas que pode provocar náuseas, vômitos e diarreias.

b) Produção de Peróxido de Hidrogênio e Dióxido de Carbono

O peróxido de hidrogênio é produzido por LABs na presença de oxigênio como resultado da ação de oxidases de flavoproteínas ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). O efeito antimicrobiano de H_2O_2 pode resultar da oxidação de grupos sulfidril e causar a desnaturação de um grande número de enzimas, além da peroxidação de lipídios de membrana; o que aumenta a permeabilidade da célula e facilita a agressão ao microrganismo (KONG e DAVISON, 1980). O H_2O_2 também pode ser precursor da produção de radicais livres bactericidas como íon superóxido (O_2^-) ou radical hidroxila (OH^\cdot) que danificam o DNA (BYCZKOWSKI e GESSNER 1988). A produção de H_2O_2 por *Lactobacillus* e *Lactococcus* inibe o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* sp. em diversos alimentos (DAVIDSON *et al.*, 1983; CORDS e DYCHDALA 1993). A produção de dióxido de carbônico também é comumente observado em culturas de BALs heterofermentativas. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, porém, o CO_2 pode criar um ambiente anaeróbio e inibir a descarboxilação enzimática e o acúmulo de CO_2 na membrana celular causando uma deficiência na permeabilidade da membrana da célula (EKLUND 1984). O CO_2 também inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas psicotróficas (FARBER, 1991; HOTCHKISS, 1999), porém, seu grau de inibição varia consideravelmente entre os microrganismos: numa concentração de 10 %, poderia baixar a percentagem de UFC bacterianas em até 50 % (WAGNER e MOBERG 1989), e em níveis de 20-50 % possui alta atividade antifúngica (LINDGREN e DOBROGOSZ 1990). A competitividade das BALs ressalta a importância de se lançar novos produtos no mercado alimentício baseados na fermentações de bactérias lácticas, no uso da preservação alimentar, a fim de aumentar a vida de prateleira de alguns alimentos, visto que em 2001 uma triagem em alimentos mostrou que os níveis de contaminação por *Salmonella* foi de 26,5 %, *Shigella* (23,1 %), *S. aureus* (23 %), *E. coli* (22,9 %) e 4,6 % por outros tipos de patógenos.

c) Produção de Ácido Fólico e Vitamina B12

Como produtoras de ácido fólico, em níveis suficientemente altos, algumas bactérias ácido-láticas podem ser usadas para enriquecer naturalmente produtos fermentados. Os níveis são tão altos que uma comparação com a síntese química tornaria a produção sintética economicamente inviável. Alguns anos atrás se puderam observar a síntese de vitamina B12 pelo *Lactobacillus reuteri*, contribuindo para uma economia sustentável (YANG, 2000).

3.7 Polissacarídeos Produzidos por Bactérias Lácticas

A habilidade dos *Lactobacillus* em produzir EPSs foi reconhecida há muitos anos. Em 1968, Kooiman (citado por YANG, 2000) foi o primeiro pesquisador a informar a estrutura de um heteropolissacarídeo. Os EPSs são produzidos como componentes de parede celular ou como metabólitos secundários pelas BALs. Algumas espécies de bactérias protegem-se formando uma cápsula de EPS em volta da célula. Os polissacarídeos podem funcionar em comidas como agentes viscosificante, estabilizador, emulsificador ou geleificante (Van den Berg *et al.* 1995). As maiores dos polissacarídeos usadas em comidas ainda são extraídas de plantas ou algas, onde grande parte é quimicamente ou enzimaticamente modificados a fim de melhorar suas propriedades reológica e de modificação de sabores e texturas. Para entender a importância da produção dos biopolímeros pelas BALs Costerton *et al.* (1987) estudaram o processo de adesão bacteriana e demonstraram que os EPSs capsulares podem promover a aderência das bactérias nas superfícies biológicas, facilitando a colonização dos nichos ecológicos na parede intestinal.

Existem dois grupos de polissacarídeos produzidos por bactérias lácteas: as dextranas, produtos dos *Leuconostoc mesenteroides*, e as glicanas (polímeros do tipo “mutans”) formadas pelos *Streptococcus mutans*, estes últimos podem ser homo ou heteropolímeros de glicose ou de frutose. As composições monoméricas dos polissacarídeos produzidos por bactérias são, normalmente, compostas por galactose e glicose ou galactose, ramnose e pentose. A quantidade e a composição química das

glicanas dependem do sorotipo da espécie das bactérias. Por exemplo, o sorotipo D de *Sc. mutans* produzem grandes quantidades de glicanas, comparada ao sorotipo C; sua solubilidade/insolubilidade também está ligada ao sorotipo das mesmas. A Quadro 4 indica as bactérias lácticas produtoras de polissacarídeos extracelulares (CERNING, 1994).

QUADRO 4 - BACTÉRIAS LÁCTEAS PRODUTORAS DE EXOPOLISSACARÍDEOS

<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Sc. thermophilus</i>
	<i>Sc. mutan</i>
	<i>Sc. sobrinus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Lb. hilgardii</i>
	<i>Lb. casei</i>
	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pc. damnosus</i>

Fonte: CERNING, 1994.

3.7.1 Homopolissacarídeos

Homopolissacarídeos é um grupo de polissacarídeos composto por um só tipo de monossacarídeo. Várias espécies de laboratório podem utilizar sacarose como um substrato específico para produzir homopolissacarídeos, como as dextranas, mutanas e levanas (SUTHERLAND, 1972 citado por YANG, 2000).

Dextrana é uma classe grande de EPS formando glicanas produzidas pelos gêneros *Lactobacilos*, *Leuconostoc*, e *Estreptococo*, dos quais as *Lc. mesenteroides* e *Lc. dextranicum* são os produtores de dextrana mais famosos. A dextrana foi o primeiro polissacarídeo produzido em escala industrial e utilizado para aumentar a viscosidade de xaropes, geléias e inibir a cristalização de açúcares (CRESCENZI, 1995). É usada também como componente básico da fase estacionária de muitos processos cromatográficos (FRANZ 1986). Esta goma pode ser produzida pela *Xanthomonas campestris*, sua produção é relativamente barata por causa da alta

conversão de substrato (glicose) em 60-70 % de polímero (sintetizado em laboratório através da dextransucrase, que catalisa sacarose para produzir D-frutose e D-glicose). (SUTHERLAND 1998 citado por YANG, 2000). As Mutanas são sintetizadas de um modo semelhante pelas *S. mutans* e *S. sobrinus* (MONTVILLE, COONEY e SINSKEY, 1978). No entanto, mutanas diferem das dextranas por conter uma alta percentagem de ligações α -1,3, o que atribui à característica insolúvel a este tipo de polímero (HAMADA e SLADE 1980). O outro tipo de homopolissacarídeo é a galactana produzida por *Lc. lactis* ssp *cremoris* HA414 (GRUTER, *et al.*, 1992). Van Geel-Schutten e colaboradores (1998) citados por YANG (2000), descreveram, pela primeira vez, a produção de uma frutana por *Lb. reuteri* cepa LB121 tendo rafinose como substrato do meio (esta cepa somente produzia os polissacarídeos na presença de sacarose como substrato).

3.7.2 Heteropolissacarídeos

Muitas cepas de BALs podem produzir heteropolissacarídeo (um polissacarídeo composto por diferentes unidades repetitivas). A composição monossacarídica destes EPSs são principalmente galactose, glicose e também pequenas quantidades de ramnose, frutose, manose e galactosamina (van den BERG *et al.*, 1995). Comparado com o homopolissacarídeo, a produção dos heteropolissacarídeos em laboratório é muito baixa (60 a 400 mg L⁻¹) (STINGELE, NEESER e MOLLET, 1996), pois geralmente, grande parte dos heteropolissacarídeos é sintetizada intracelularmente.

3.7.3 Estudos Clínicos no Tratamento de Câncer, Hipolipidemia e Imunodulação

A estimulação do sistema imune ou sua imunomodulação é considerada o mecanismo que dá suporte aos probióticos. Dados de estudos epidemiológicos e experimentais indicaram que a ingestão de algumas BALs ou de produtos fermentados poderia aliviar o risco de certos tipos de câncer, além de inibir o crescimento de tumores e modular a resposta imunológica do indivíduo (ativando macrófagos e secretando imunoglobulinas) (HONG, *et al.*, 2004; KAILASAPATHY e CHIN 2000; KATO, ENDO, YOKOKURA, 1994; PERDIGÓN *et al.*, 1999, 2001 citados por

LeBLANC, 2005). Os efeitos benéficos para a saúde vão além da imunoestimulação mostrando também, atividade antimicrobiana, hipocolesterolêmica (PIGEON *et al.*, 2002; KITAZAWA *et al.* 1998; CHABOT *et al.*, 2001 citados por RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005). Porém, o mecanismo preciso pelo qual isto acontece ainda é desconhecido.

Um dos efeitos mais interessantes dos probióticos é a atividade anticancerígena. A grande maioria dos estudos nesta área está relacionada aos efeitos de proteção contra o câncer de cólon que é o segundo colocado em casos de mortalidade, perdendo para o câncer de pulmão nos homens e câncer de mama nas mulheres. Mais de 75 % dos casos de câncer de cólon estão associados à dieta alimentar. Alguns dos mecanismos pelos quais os probióticos podem inibir o câncer de cólon são: a) alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal; b) alteração das condições físico-químicas do cólon; c) degradação de compostos carcinogênicos; d) produção de compostos antitumorais; e) aumento da imunidade e efeitos na fisiologia do hospedeiro (RAFTER, 2003). Embora vários agentes sintéticos exibam atividades anticancerígena, antioxidativa e imunoestimuladora, estes agentes além de caros, levantam dúvidas quando à estabilidade e segurança de uso em longo prazo. Miettinen, Vuopio-Varkila e Varkila (1996), investigaram o papel das citocinas nas interações entre as bactérias ácido-láticas e o sistema imune mediante a produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 no sangue periférico humano após sua estimulação com o consumo de bactérias vivas. A produção do TNF- α , da IL-6 e, em alguns casos, da IL-10 foi induzida em quantidades bem mais elevadas comparados aos resultados obtidos pela estimulação com lipopolissacarídeos. Os autores sugerem que as bactérias ácido-lácteas podem estimular a resposta imune não específica.

O EPS produzido pelo *Lb. helveticus* ssp. *jugurti* descrito por Oda *et al.* (1983), foi testado contra ascite induzida pelo Sarcoma-180. O EPS foi injetado intraperitonealmente e a dose usada nos camundongos foi de 20 mg kg⁻¹ durante nove dias consecutivos. As cobaias tiveram um aumento de sobrevida de 144 %; este valor

saltou para 233 % quando a dose intraperitoneal de EPS foi de 40 a 80 mg kg⁻¹. Os autores concluíram que a atividade antitumoral do EPS poderia estar baseada em sua atividade mediadora da resposta imune. Em outro estudo conduzido por Forsen *et al.* (1987) a fim de entender a atividade antitumoral e o efeito do EPS sobre o sistema imune, foram investigadas cepas produtoras de EPS mostrando que moléculas da superfície celular, provavelmente, o ácido lipoteicoico de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* T5 ativam as células T dos linfócitos humano. De maneira similar, EPSs produzidos por *Bifidobacterium adolescentis* demonstraram efeitos imunodefinidos em esplenócitos de ratos (GOMEZ *et al.* 1988). Kitazawa, Yamaguchi e Itoh (1992) demonstraram que *Lc. Lactis* ssp. *cremoris* KVS20, tem atividade antitumoral, ativando fortemente células B dependentes de substâncias mitógenas.

Choi *et al.* (2006), afirmaram que frações de polissacarídeo solúvel de *L. acidophilus* podem constituir um novo agente anticancerígeno (terapia e prevenção) com baixo grau de citotoxicidade para as células normais e NK, e alto grau de seletividade contra células cancerígenas HT-29, na concentração de 10 mg ml⁻¹. Foram testados diferentes tipos de linhagens celulares de cânceres como: de cólon HT-29, cervix HeLa, mama MCF-7, cérebro U-87, Liver HepG-2, pâncreas PANC-1, fibroblastos HeF - ; o efeito foi atribuído à indução da apoptose das células malignas pelo EPS produzido pelo *Lactobacillus*, como revelado pela fragmentação do DNA e presença de Bcl-2 positiva. Segundo os autores, este foi um dos primeiros relatos de indução a apoptose por biopolímero produzido por *L. acidophilus*, embora o mecanismo de apoptose pelo qual o EPS solúvel do *L. acidophilus* 606 inibe a proliferação da célula maligna ainda não está bem compreendido, acredita-se que esteja relacionado com a modulação das proteínas reguladoras da sinalização da apoptose. Este experimento focou também a atividade antioxidante das células inatas e dos componentes enzimáticos, inclusive superóxido dismutase ou catalase, e determinaram que as frações polissacarídicas que atuam como um componente enzimático responsável pela atividade antioxidante nas células.

LeBlanc *et al.* (2005), utilizou ratos para demonstraram que a ingestão de leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* R389 modula o sistema imune e previne

câncer em cobaias hormônio-dependente. Os animais foram alimentados com o fermentado; o grupo controle não recebeu nenhuma alimentação especial. Ao término do período que durou 2 a 7 dias, os ratos receberam uma injeção subcutânea de células tumorais na glândula mamária. As células tumorais foram isoladas e monitoradas periodicamente; a presença de Bcl-2 positiva foi encontrada, evidenciando apoptose no tecido de tumoral. Após sete dias de alimentação foi observado um aumento no número de células que sofreram apoptose, diminuição do tumor e modulação da resposta imune. IL-10 e IL-4 aumentaram no grupo com câncer e uma diminuição de IL-6 (citocina envolvida na síntese de estrógenos). O que não foi observado no grupo controle. O leite fermentado por *L. helveticus* R389 foi capaz de modular a relação entre sistema imune e endócrino por diminuição da IL-6, muito importante na apoptose celular induzida e em tumor estrógeno-dependente. Nakajima *et al.* (1992), descreve a produção de um EPS em leite fermentado pela cepa *Lc. lactis* ssp. *cremoris* SBT0495 que teve atividade hipoclosterolêmica.

Devido ao papel da dieta em doenças humanas como o câncer, as BALs estão sendo alvo de estudos como alimento dietético com potencial para prevenir o câncer de cólon e outros, além da redução da viabilidade das células cancerígenas (KIM *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004). Logo, estes EPS podem ser aplicados em alimentos e usados como suplementos na terapia do câncer.

3.8 Condições de Crescimento para Bactérias Lácticas

Vários fatores podem afetar o crescimento de uma população bacteriana, incluindo o tipo de ambiente, número de indivíduos na população, interações dinâmicas com outras populações bacterianas, presença de outros microrganismos, fatores químicos e físicos tais como disponibilidade de nutrientes essenciais, temperatura, pH, osmolaridade, pressão hidrostática, concentração de oxigênio, luz, radiação ionizante ou ultravioleta, presença de metabólitos tóxicos resultantes do metabolismo das células da população em crescimento ou presença de agentes antimicrobianos. Os microrganismos podem viver em um grande número de ambientes. Geralmente as bactérias lácticas são mesófilas, mas podem crescer em

temperaturas tão baixas quanto 5°C ou tão altas quanto 45°C. Enquanto a maioria das cepas cresce bem em pH 4,0-4,5, algumas mantêm-se ativas em pH de 9,6 ou 3,2 (ROSS, MORGAN e HILL, 2002). Para a produção de seus metabólitos, as bactérias exigem presença de substratos específicos ou limitação desse substrato, como por exemplo, fonte de carbono, nitrogênio ou mesmo deficiência de fosfato (CERNING, 1994). Algumas cepas estudadas para melhorar as condições de crescimento e produção de EPSs estão descritas no Quadro 5. As fontes de carboidrato e nitrogênio oferecidas às cepas implicam no aumento ou na diminuição da biomassa celular e da produção do biopolímero de interesse. Por isso, um planejamento experimental envolvendo tempo de incubação, variação de temperatura e adição dos substratos adequados é significativamente importante para a execução de um trabalho que envolva este tipo de beneficiamento.

QUADRO 5 - CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS BALs PARA PRODUÇÃO DE EPSs

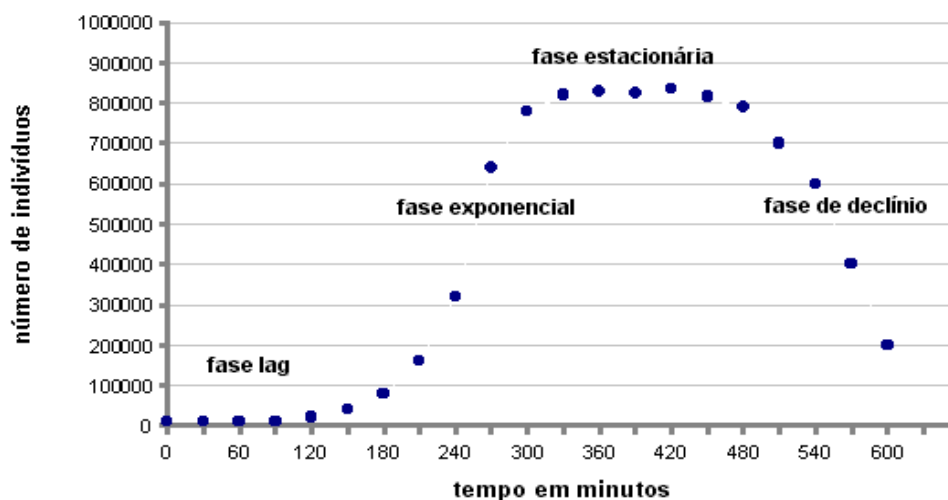
CEPA	MEIO DE CULTIVO	CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO
<i>Lactobacillus</i> sp.		
<i>fermentum</i> G1.2.1	MRS	37°C, 18h
<i>helveticus</i> ÅKi4	MRS	37°C, 45h
<i>helveticus</i> Lb161	Leite desnatado	37°C, 20h
<i>helveticus</i> K16	Leite desnatado	37°C, 24h
<i>rhamnosus</i> LC 705	Leite desnatado	30°C, 24h
<i>rhamnosus</i> GG	Lactose de leite hidrolisada	30°C, 20h
<i>casei</i> ssp. <i>casei</i> LC-10	MRS	37°C, 72h
<i>casei</i> SHIROTA	MRS	37°C, 25h
<i>paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LB1931	MRS	37°C, 72h
<i>Lactococcus</i> sp		
<i>lactis</i> ssp. <i>cremosis</i>	Leite desnatado	25°C, 18-20h
<i>Streptococcus termophilus</i> TSH	Leite desnatado	37°C, 20h

Fonte: Yang, 2000.

3.8.1 Fases do Crescimento Bacteriano

A curva de crescimento da Figura 7 representa as quatro fases do crescimento populacional bacteriano em uma situação próxima da real quando uma população de bactérias cresce em um ambiente fechado (modelo baseado no cultivo da bactéria *E. coli* em um meio de cultura rico e sob condições aeróbicas) (MORETTI, 2007).

FIGURA 7 – PADRÃO TÍPICO DE CRESCIMENTO DE UMA CULTURA BACTERIANA



FONTE: Moretti, 2007

1 - *Fase lag* - fase de adaptação metabólica ao novo ambiente; o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais encontradas pelas células. O número de indivíduos não aumenta nesta fase, podendo até mesmo decrescer. A duração dessa fase depende das condições ambientais nas quais as células se encontravam anteriormente.

2 - *Fase exponencial* – fase na qual o número de células da população dobra a cada geração. A taxa de crescimento não pode ser mantida indefinidamente em um sistema fechado. Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes essenciais, acúmulo de metabólitos tóxicos e limitação de espaço. À medida que a disponibilidade de nutrientes diminui as células se tornam menos capazes de gerar ATP e a taxa de crescimento se reduz. A duração da fase exponencial é altamente variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais.

3 - *Fase estacionária* - fase em que a taxa de crescimento diminui significativamente devido às condições limitantes do meio. As células continuam metabolizando e se dividindo, mas parte das células torna-se inviável e a taxa de divisão celular é muito próxima da taxa de morte celular, o que mantém constante o número de células viáveis

na população. A curva de crescimento atinge um platô. A duração da fase estacionária depende do balanço entre a taxa de divisão celular e o número de células que vão se tornando inviáveis (morte celular ou incapacidade de se dividir) devido às condições ambientais tornarem-se progressivamente desfavoráveis.

4 - *Fase de declínio* - fase em que as células perdem a capacidade de se dividir; a taxa de morte celular torna-se maior que a taxa de divisão e o número de células viáveis decresce exponencialmente até a completa extinção da população. Nesta fase muitas células assumem formas incomuns. Em bactérias formadoras de esporos sobrevivem mais esporos que células vegetativas. A duração desta fase é variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais.

3.9 *Lactobacillus paracasei* E ESTUDOS CLÍNICOS DA SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam-se na forma de bacilos ou cocabacilos, isolados ou em cadeias. Requerem nutrientes complexos, são anaeróbicos ou aerotolerantes e acidofílicos, com um pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2. Crescem em um largo espectro de temperatura, de 2 a 53 °C. Lactobacilos são encontrados nos mais diversos habitat, tais como mucosas de humanos e animais (cavidade oral, intestino e vagina), em plantas ou material de origem vegetal, nas fezes e em substratos manipulados como alimentos fermentados. A espécie *Lactobacillus paracasei* apresenta-se na forma de bacilos de tamanho variando de 0,8-1,0 µm de espessura por 2,0-4,0 µm de comprimento possuem extremidades arredondadas, podendo vir ou não em cadeia. As células podem crescer a 10 e a 40° C (HAMMES e VOGEL, 1995). Conhecem-se duas subespécies: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*. Cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* foram isoladas do homem, de produtos lácteos, de silagem e do esgoto (HAMMES e VOGEL, 1995).

Nas revisões bibliográficas, pouco se sabe sobre EPS produzido por *Lb. paracasei* e sua aplicação biotecnológica e na saúde. Robijin, *et al.* (1996), estudam a

estrutura do EPS produzido por *Lactobacillus paracasei* 34-1 em um meio semidefinido. O EPS é um heteropolímero constituído de unidades repetidas e composto por D-galactose, 2-acetamido-2-deoxi-D-galactose e fosfato; na relação molar de 3:1:1.

Vinte e sete cepas de bactérias lácticas pertencentes às espécies foram testadas para avaliar sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol do sangue: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii* e *Pediococcus pentosaceus*. As cepas *Lb. Paracasei* subsp. *paracasei* e *Lb. rhamnosus* apresentaram maior capacidade de redução, superior aos níveis encontrados por *Lb. gasseri* e *Lb. reuteri* estirpes. É possível que a capacidade de reduzir colesterol das cepas pode estar relacionada com a resistência a bile (JAHREIS *et al.*, 2002) .

Dez mulheres e 10 homens consumiram diariamente 50 g de salsicha probiótica (fermentada com *Lactobacillus paracasei* LTH 2579) ao longo de 5 semanas. Após um período de controle convencional com salsicha foram colhidas amostras de sangue: no início do estudo, no final de cada período, e depois de 2 semanas do consumo das salsicha probiótica. Também foram colhidas amostras de fezes no 3 ° e 9 ° dia da dieta definido no final de cada período e durante um período pós-consumo. Alguns parâmetros imunológicos foram analisados além de colesterol total, colesterol HDL e LDL, triacilglicerídeos e anticorpos contra LDL oxidada. Em amostras fecais, houve um aumento estatisticamente significativo no número de *Lb. paracasei* LTH 2579, mas não em todos os voluntários. Não houve influência dos probióticos sobre a concentração sérica do colesterol, suas frações e triacilglicerídeos. Porém, no final da intervenção, um significativo aumento no título de anticorpos contra LDL oxidada foi medido. As mudanças imunológicas estavam dentro dos parâmetros fisiológicos de variação. Os valores para CD4⁺ (T-auxiliares) - aumentou após 2 semanas de suplementação com *Lb. paracasei*, mas diminuiu para valores normais, até ao final do estudo. Uma correlação positiva significativa entre o número de *Lb. paracasei* nas fezes, bem como a percentagem de células CD4⁺ foi encontrada. A expressão do CD54 (ICAM-1) em linfócitos diminuiu significativamente após o

consumo da salsicha fermentada. O índice granulócitos de fagocitose aumentou, em comparação ao grupo controle. Esses achados fornecem evidências de que *Lb. paracasei* LTH 2579 aplicadas em alimentos pode modular a imunidade do indivíduo (JAHREIS *et al.*, 2002) .

3.10 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Diferentes meios de cultivos são usados em diferentes pesquisas quantitativa e qualitativamente para determinar a influência dos nutrientes no crescimento das cepas e na produção de biopolímeros em laboratórios (RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005). Vaningelgem *et al.* (2004) indicou que as glicomananas, polímeros de carboidratos, presentes em extrato de levedura e peptona produzem um complexo no meio de cultura que interfere na quantificação dos EPS. Os meios semidefinidos também eliminam componentes que interferem na quantificação do EPS (KIMMEL, ROBERTS e ZIEGLE, 1998); os meios quimicamente definidos que contêm fontes de carbono, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos e minerais tem sido desenvolvido para facilitar a análise de EPS.

Em geral, a complexidade do método usado para o isolamento e purificação dos EPSs depende do meio de cultivo usado para a produção deste. Os métodos mais simples envolvem diálise do meio, após a centrifugação de biomassa, seguida de liofilização. Esta técnica é usada para isolar EPS de *Lc. lactis* spp. *cremoris*, quando as cepas se desenvolvem em meios quimicamente definidos (MARSHALL *et al.*, 1995; VAN KRANENBURG *et al.* 1997 citados por RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005). A precipitação por etanol é usada para concentrar o EPS antes da diálise, esta técnica é frequentemente usada para isolamento de biopolímeros de *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Strep. thermophilus* ou *Lactococcus* e *Lactobacillus*, além de isolamento de EPS de fungos como *A. blazei*, *Ganoderma lucidum*, *P. ostreatus*, *L. eodes*, dentre outros (VAN GEEL-SCHUTTEN *et al.*, 1999; PETRY *et al.*, 2000; TORINO *et al.*, 2000; DAL BELLO *et al.*, 2001; DEGEEST *et al.*, 2001a;

RIMADA e ABRAHAM, 2001; RICCIARDI *et al.*, 2002 citados por RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005; RUBEL, 2007).

Quando o meio de cultivo é complexo, uma purificação adicional tem sido proposta a fim de reduzir a proteína adicional do meio e outros componentes da precipitação final. Para a obtenção do EPS em meio com uma alta concentração de proteína, como leite e leite desnatado é comum o uso de TCA, na concentração final de 4 a 14 %, digestão com proteases ou a combinação dos dois. Assim, o exopolissacarídeo precipitado fica parcialmente livre das proteínas contaminantes do meio de cultivo. Técnicas que envolvam a inativação pelo calor também são utilizadas, seguidas da precipitação etanólica. O uso de etanol e acetona, ou a mistura dos dois é um processo comumente utilizado. Outras técnicas incluem membranas de filtração, microfiltração, ultrafiltração, UF e diafiltração (TUINIER *et al.*, 1999b; YANG *et al.*, 1999, 2000; STAAF *et al.*, 2000; BERGMAIER *et al.*, 2001; LEVANDER *et al.*, 2001 citados por RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005).

3.11 REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGRO-INDÚSTRIAIS

Qualquer produto de natureza orgânica, basicamente produtos da agricultura ou subprodutos de processamento de vegetais podem constituir-se substrato para processos fermentativos (REGULY, 1996). A indústria agro-alimentar produz uma grande quantidade de resíduos e sobras vegetais que podem chegar a ser maior que a parte utilizada para fins alimentícios ou industriais: a produção agrícola corresponde a apenas 5 % de nutrientes em potencial e os 95 % restantes são constituídos de palhas e bagaços. Dentre os possíveis usos desses resíduos, destacam-se a biotransformação e a bioconversão em matéria orgânica aplicados em solo e como alimentos para os ruminantes, ou ainda utilizados para a produção de biomassa protéica de fungos e bactérias.

Estão sendo desenvolvidas tecnologias que visam utilizar em potencial todas as matérias-primas para seu aproveitamento como subprodutos em FES e FS (SALES *et al.*, 1988). De um modo geral, os substratos para o crescimento de fungos são

similares aos das bactérias. A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação e para a obtenção do produto final desejado. Os resíduos de origem agro-industrial, tais como: polpa de café, farelo de cereais, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros, são substratos bastante difundidos nestes processos (GUTIERREZ-ROJAS e TORRES, 1992). O carbono, assim como o nitrogênio, é vital para o crescimento de microrganismos em geral, pois são os constituintes básicos da matéria celular dos seres vivos. O efeito da relação C/N é um fator fundamental a ser estudado com o objetivo de fornecer ao microrganismo condições ótimas de crescimento.

Para a produção de biomassa microbiana, relações C/N entre 4,7 e 42 foram estudadas por Soccol (1994); o objetivo do estudo era o enriquecimento protéico do bagaço de mandioca por fermentação em meio sólido, com *Rhizopus oryzae*. Neste estudo a maior produção de biomassa foi conseguida com relação C/N de 4,7; relações C/N maiores limitavam o crescimento do fungo, levando a valores menores de proteína no produto fermentado. Além da relação carbono/nitrogênio, os microrganismos exigem macronutrientes, fundamentais, para o seu metabolismo, como fósforo, cálcio, ferro, magnésio, potássio e enxofre; além dos microelementos como manganês, zinco, cobre e cobalto. As condições em que se processam as fermentações também devem ser monitoradas e controladas. Os fatores mais importantes são: temperatura, o pH, a aeração e a agitação contínua do meio. A temperatura de cultivo para fungos está situada geralmente entre 22 a 29 °C, estando o pH compreendido entre 4,5 e 7,0.

In natura o desenvolvimento de cogumelos é um processo lento, podendo levar meses para produzirem seus corpos de frutificação (HABJANIC; BEROVIC, 2000 citado por RUBEL, 2006). Em condições artificiais de monitoramento o micélio pode ser obtido em pouco tempo, o que favorece as pesquisas científicas. Devido à facilidade da técnica, baixo custo e tempo reduzido, podem-se utilizar esta técnica para beneficiamento, agregação de valor e aplicação de resíduos; tornando-se muito atrativo na biotecnologia industrial.

A otimização da composição do meio de cultivo mostra-se uma estratégia efetiva para a obtenção de metabólitos secundários *in vitro*. Um meio de cultivo que ofereça condições ótimas ao crescimento da biomassa celular é, via de regra, antagônico à síntese do composto secundário. Em função disto, o estabelecimento de um meio de cultivo adequado, envolvendo dois estágios tem sido proposto como estratégia para superar a condição de antagonismo entre o crescimento celular e a biossíntese do biopolímeros de interesse. Este sistema consiste no cultivo celular de modo a favorecer ao máximo o acúmulo de biomassa, seguido da produção, onde a biossíntese do metabólito de interesse é favorecido (MARASCHIN, 1998). Micro e macroelementos também possuem um importante papel no metabolismo dos microrganismos, principalmente como co-fatores de enzimas (JONATHAN e FASIDI, 2001). A bioquímica comparada indica a existência de vias metabólicas básicas e gerais das quais participam muitos compostos orgânicos que são denominados metabólitos (LACAZ *et al.*, 1975).

3.11.1 Potencial Aplicação dos Resíduos da Soja como Substrato

O Brasil é o segundo maior exportador de grãos de soja (*Glycine max*) do mundo e o principal exportador de farelo de soja, com 32% do mercado mundial, que representam 75% da produção brasileira (ROESSING, 1995), uma produção estimada em 18,86 milhões de sacas por ano. Em 2001, é possível de que tenha havido um aumento de cerca de 10% a mais que no ano de 2000, ou seja, foram aproximadamente, 12,7 milhões de toneladas. As previsões para receita do complexo soja (grãos, óleos e farelo) mostram um aumento de até 14 %, algo em torno de US\$ 4,8 bilhões. A área plantada foi de 13,7 milhões de hectares na safra de 2000/2001. O farelo de proteína de soja, obtido após a extração do óleo dos grãos de soja, constitui-se num resíduo industrial que, muitas vezes, não é aproveitado pelas empresas. Sob o ponto de vista econômico e ambiental, este procedimento é incorreto, pois, tais resíduos podem ser utilizados em outros processos industriais ou como substrato para fermentação sólida e/ou submersa visando à formação de produtos com maior valor

agregado, como alguns metabólitos biomedicinais produzidos por bactérias, fungos e leveduras, potencialmente comerciais.

A soja contém compostos bioativos capazes de trazer muitos benefícios ao homem. A isoflavona, por exemplo, representa uma classe de compostos químicos conhecidos como fitoestrógenos encontrados em grãos de soja e produtos derivados, ligados ou não a moléculas de açúcar. Existem dois principais tipos de isoflavonas de soja são as genisteína e daidzeína, ou suas respectivas formas com glicosídeos, a genistina e daidzina, - compostos que possuem atividade antiproliferativa de células cancerígenas – (FERRARI e DEMIATE, 2001). Estes compostos bioativos e não nutricionais apresentam estrutura química semelhante ao estradiol (principal hormônio feminino) e assim se encaixam nos receptores de estrógeno, tendo habilidade de imitar estes hormônios, atraindo assim, a atenção de muitos pesquisadores para seus efeitos e benefícios, principalmente em relação à reposição hormonal. Alimentos a base de soja também recebem considerável atenção pelo potencial papel na prevenção e tratamento de câncer e osteoporose. Os baixos índices de mortalidade pelo câncer de mama em países asiáticos e o consumo de soja por estes povos alimentam a especulação de que a ingestão da soja e derivados reduz o risco do desenvolvimento da doença. Porém, os dados epidemiológicos ainda são limitados para sustentar esta hipótese. Há dados mais consistentes de redução do risco de câncer de próstata (MESSINA, 1999). O consumo da proteína da soja também tem sido associado com a redução da hipercolesterolemia e do risco de complicações cardíacas.

Dos resíduos de produtos industrializados à base de soja consumidos nos países asiáticos poucos são reaproveitados ou transformados. Já nos E.U.A., praticamente todo o resíduo de derivados da soja é processado. Alimentos a base de soja contêm uma mistura complexa de compostos bioativos que agem por si só ou pela interação com outros compostos ou moléculas do organismo do indivíduo. Plewa *et al.* (1991) demonstraram que o extrato alcoólico de um subproduto do processamento da soja foi capaz de reprimir danos induzidos no DNA e mutações em células de mamíferos. Concluindo que produtos e subprodutos da soja podem ser importantes fontes de aditivos alimentícios quimioprotetores. Hsu *et al.* (1999) utilizou o fitoestrogênio para

inibir a proliferação de células de carcinoma humano em concentrações acima de 25 mg/mL. O conteúdo total de isoflavona na soja varia de 46 a 309 mg/g. A liberação de peptídeos e aminoácidos pela hidrólise ácida da proteína da soja pode facilitar a captação dessas moléculas por um determinado microrganismo, que possivelmente acarretará na maior produção dos metabólitos de interesse.

4 MATERIL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A caracterização bioquímica dos EPSs e os testes *in vivo* foram aprovados pelo CEEA e desenvolvidos no Setor de Ciências Biológicas no Laboratório de Bioquímica de Carboidratos e Laboratório de Fisiologia.

4.1 REAGENTES

O farelo de soja, contendo 70 % de proteína, utilizado neste trabalho foi cedido pela INCOPA LTDA.

A cromatografia de filtração em gel foi desenvolvida em Sepharose CL-6B e gel Sepharose 6B, SIGMA.

A coluna utilizada para o FPLC foi a Superose-6[®] da Pharmacia Biotech.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os substratos do meio de cultivo, a biomassa seca e o EPS foram pesados em balança semi-analítica MARTE modelo AL 500 e analítica Scientech SA 120.

Os meios de cultivo, soluções e demais materiais foram esterilizados em autoclave vertical Phoenix, Modelo AV 75.

As inoculações dos microrganismos e manipulação de células foram feitas em câmara de fluxo laminar (Veco[®]).

Para os cultivos em forma estática a 29 e 37°C foi usada a estufa de cultivo Biopar[®]. Os cultivos líquidos foram mantidos em incubadora orbital Incubator Shaker C25KC– New Brunswick Scientific[®].

A determinação do pH foi feita em potenciômetro HI9321 Microprocessor pHmeter da Hanna instruments[®].

A bomba de pressão reduzida utilizada para separar a biomassa do meio de cultivo foi a Tecnal TE-058.

Para concentrar o caldo de cultivo dos microrganismos foi utilizada a estufa a vácuo VACUCELL® e a setufa de secagem Biopar a 45-50°C.

Volumes de até 45 mL foram centrifugados na centrífuga SORVALL® Legend™ MACH 1.6/R.

Os polissacarídeos foram liofilizados no EDWARDS freeze dryer, Modulyo™.

As determinações fotométricas de açúcares totais, redutores, proteínas e outros foram realizados em espectrofotômetro Power Wave XS, BioTek Programa: KC Jr.

O espectrofotômetro usado para verificar o crescimento bacteriano foi o Spectrophotometer Spectrumlab 2PC.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (MEV) foram obtidos pelo aparelho BRUKER®, série Avance - DRX 400, incorporado a Transformada de Fourier do laboratório de Bioquímica de Carboidratos da UFPR.

O parrelho de FPLC utilizado foi da Pharmacia Biotech®.

O microscópio utilizado para microscopia óptica foi o Olympus-COVER-018 e para análise MEV foi um EVE Jeol JSM-6360 LV em diferentes aumentos.

4.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A espécie de *Agaricus brasiliensis* foi utilizada com sucesso por Fan (2000), Gern (2005), Rubel (2006) e Dalla'Santa (2006) em experimentos contra o Sarcoma 180. Foram utilizadas neste trabalho a cepa LPB 03 do Basidiomiceto *Agaricus brasiliensis* e a Bactéria Láctica B7. Os microrganismos fazem parte do banco de cepas do do Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR.

4.3.1 Cultivo de *A. brasiliensis*

A linhagem foi mantida em Ágar Batata Dextrose (BDA) em placas-de-Petri, incubadas a 28 °C por 1 semana sob refrigeração (RUBEL, 2006) ou por estoque em água destilada estéril a 4 °C, com repiques trimestrais (NAKASONE, PETERSON e JONG, 2004) (Figura 8).

Após o preenchimento de toda a placa-de-Petri pelo fungo, o micélio foi delicadamente raspado e transferido para 300 mL de meio de cultivo básico em frascos Erlenmeyer, segundo Fan (2000). A cultura foi acondicionada a 29°C ($\pm 0,2$), 120 rpm em agitador rotatório de bancada. Após sete dias, o micélio foi separado do sobrenadante e a biomassa passada por uma peneira (0,5 mm²) com auxílio de uma espátula, a fim de se obter uma suspensão de hifas trituradas (DALLA'SANTA, 2006, GERN, 2005 e RUBEL, 2006). Esta suspensão continha 1,30 mg de micélio seco/mL e era mantida a 4°C por, no máximo, 2 semanas e usada com pré-inóculo para o lançamento das fermentações.

Para as fermentações, 3 % da suspensão do pré-inóculo (v/v) foram adicionados a frascos Erlenmeyeres contendo 500 mL de meio de cultivo Fan (2000) enriquecidos ou não com 5 % de proteína de soro hidrolisada (PSH) (Tabela 2). As fermentações foram realizadas em agitador de bancada (29°C \pm 0,2, 120 rpm). Diariamente, as fermentações foram interrompidas para a retirada de 45 mL para análise.

FIGURA 8 – ASPECTO DO MICÉLIO DE *A. brasiliensis* EM PLACA DE PETRI CONTENDO PDA



TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA *A. brasiliensis*

MEIOS DE CULTIVO*	BÁSICO	PSH	PSH + Tw
COMPONENTES		g/L	
Sacarose/Glicose	20	20	20
Extrato de levedura	3,95	3,95	3,95
K ₂ HPO ₄	0,6	0,6	0,6
MgSO ₄	0,3	0,3	0,3
PSH	-	5 %**	5 %**

* pH 6,1; ** v/v, temperatura 29±2 °C e agitação a 120 rpm

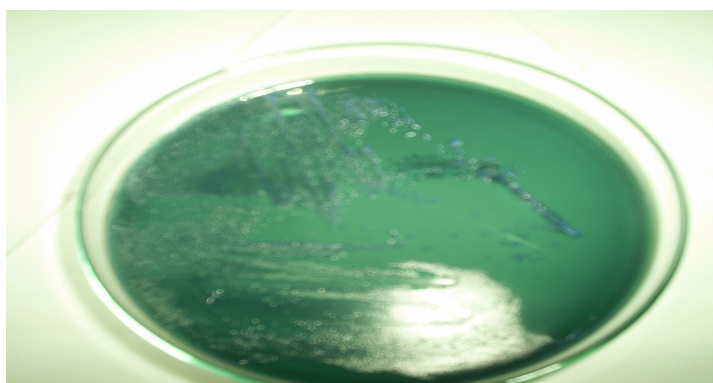
4.3.2 Bactéria Láctica

4.3.2.1 Identificação da Bactéria Ácido-Lática (BAL)

A BAL estudada foi isolada de uma amostra de leite fermentado pelo pesquisador e professor José Luis Parada.

Fez-se estoque das bactérias em MRS contendo 30 % de glicerol (LIMA, 2004). Os parâmetros fisiológicos padrão da cepa foram determinados pela fermentação de carboidratos em meio contendo púrpura de bromocresol (indicador), usando o kit API 50 CHL de acordo com as instruções do fabricante BioMérieux®. As leituras foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação a 37 °C. A produção de ácidos orgânicos durante a incubação altera o pH e promove mudança de coloração do indicador, para amarelo. O gênero e a espécie do microrganismo analisado foram interpretados pelo programa estatístico API 50 CHL v 5.1 (BIOMÉRIEUX, 2007).

FIGURA 9 – COLÔNIAS DA BACTÉRIA LÁCTICA EM PLACA DE PETRI CONTENDO MRS



4.3.2.2 Condições de crescimento

Para a ativação do pré-inóculo, duas a 3 três colônias isoladas das placas-de-Petri mantidas sob refrigeração, foram retiradas com alça de platina e inoculadas em 50 mL de caldo MRS. O meio foi incubado a 37°C por até 24 h período no qual o *Lactobacillus* ainda estaria na fase de crescimento exponencial. Dado o tempo de incubação, 3 % do pré-inóculo foi reativado em 300 mL de meio M 4 (Tabela 3) a 37°C. O crescimento da bactéria foi medido de 12 em 12 h por densidade óptica (DO) $\lambda=660$ nm. A taxa de crescimento na fase exponencial foi calculada por:

$$M = \frac{\ln X - \ln X_0}{\Delta t}$$

Onde X_0 Início é a densidade óptica no início, X é a densidade óptica no final do crescimento e Δt é o intervalo de tempo (KASK *et al.*, 2003). O número de bactérias por contagem foi determinado por contagem seguindo o método “drop plate” (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982 citados por PRADO, 2007). O cultivo foi interrompido periodicamente para análise cinética.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS PARA O CRESCIMENTO DA BACTÉRIA LÁTICA

COMPONENTES MEIOS*	MRS	M 4
	g/100 mL	
HPS	-	15 %**
Glicose	2	0,5
Extrato de levedura	0,5	0,1
Peptona bacteriológica	1	-
Extrato de carne	1	-
Sulfato de Manganês (MnSO ₄)	0,005	0,2
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,01	0,03
Fosfato dipotássio (K ₂ HPO ₄)	0,2	0,06
Acetato de sódio	0,5	-
Tween 80	0,1	0,1
Citrato de Amônio	0,2	0,2

* para meio sólido usar 1,5 g de ágar; ** v/v, pH 6,5, 37C, crescimento de forma estática

4.3.3 Co-cultivo da Bactéria Láctica e *Agaricus brasiliensis*

No co-cultivo, os meios e procedimentos utilizados para o pré-inóculo foram os mesmos. No entanto, para o cultivo em paralelo, somente após dois dias de fermentação de *A. brasiliensis* (nas condições já estabelecidas), adicionou-se 15 % do pré-inóculo da bactéria láctica B7, que estava a 37°C. O co-cultivo foi mantido nas mesmas condições de fermentação do *A. brasiliensis*, desenvolvido em triplicata e interrompidos em intervalos de tempos para análise.

4.4 PREPARO DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA

O farelo de soja, cedido pela empresa IMCOPA, contendo 70 % de proteína foi pesado (150 g.L⁻¹) e diluído em água destilada. O pH foi ajustado para 2.0 com HCl 1 M e a amostra foi esterilizada a 121° C, 1 atm de pressão por 1h. As frações sólidas foram separadas com auxílio de um coador de pano; o sobrenadante foi neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado a 4.700 rpm por sete minutos. As partículas sólidas foram descartadas e o sobrenadante, - que continha cerca de 0,48 g de proteína/mL - , distribuído em frascos de vidro e, novamente esterilizados por 15 minutos e armazenados em freezer para evitar possíveis contaminações.

4.5 ISOLAMENTO DA BIOMASSA E TRATAMENTO DO SOBRENADANTE DE *A. brasiliensis*, BAL E O CO-CULTIVO

Dado o período de incubação de *A. brasiliensis*, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração em bomba de pressão reduzida. A massa micelial retida foi levada à estufa a 45°C (± 5) e mantida em dessecador 10 minutos antes de ser pesada. O sobrenadante dos cultivos foram concentrados até pelo menos 1/3 do volume inicial, utilizando estufa a vácuo por aproximadamente 6-12 h a 45°C ou estufa de secagem a 47°C por até 2 dias (neste último caso, adicionava-se 1/3 de álcool para evitar contaminação).

A biomassa bacteriana foi obtida após centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. As células foram lavadas com água destilada e levadas para estufa de secagem a 100°C durante 18 h, posteriormente mantidas em dessecador por 10 minutos antes de serem pesadas. O sobrenadante da fermentação bacteriana foi concentrado da mesma forma que sobrenadante de cultivo do fungo.

Os procedimentos para retirada da biomassa pelo co-cultivo são os mesmos: o fungo foi retirado por filtração usando bomba de pressão reduzida. Em seguida, o sobrenadante que continha bactéria foi centrifugado (10.000 x 10 minutos) e reduzido a 1/3 do volume inicial, nas condições descritas.

4.6 EXTRAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

4.6.1 Precipitação por Etanol

Para cada uma parte da amostra, adicionou-se duas a quatro partes de álcool etílico (96° GL, -18° C). A mistura foi mantida *over night* a baixa temperatura, 4°C (DALLA'SANTA, 2006; RUBEL, 2006), o precipitado foi então recuperado por centrifugação (10.000 rpm, 10 min.) e re-dissolvido em água destilada. Seguiu-se com a diálise da amostra em sacos de 8000 Da e liofilização do precipitado (CUESTA, 2002).

4.6.2 Precipitação Prévia com TCA Seguida por Etanol

Uma solução de TCA (80 % p/v) foi adicionada ao sobrenadante (1:6). A mistura foi homogeneizada durante 10 minutos (pode usar vórtex) e centrifugada (10.000 rpm x 10 minutos). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionou-se duas a quatro partes de etanol (96° GL; 4 °C for 18 h); a mistura foi novamente centrifugada seguida de diálise e liofilização.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS DO EPS

4.7.1 Determinação de Açúcares

Para a determinação de açúcares totais optou-se pela adaptação do método de Dubois *et al.* (1956), modificado por Cuesta *et al.*, (2002). Este método é uma reação colorimétrica freqüentemente usada para determinar mono e oligossacarídeo, simples e econômico. Enquanto a quantificação dos açúcares redutores foram determinados segundo o método de Somogyi-Nelson (1944), o qual fundamenta-se na reação de oxirredução em que o meio alcalino reage com arsenomolibdato formando um complexo azul cuja intensidade é proporcional ao Cu_2O formado. Este por sua vez é diretamente proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes na amostra.

4.7.2 Quantificação de Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry *et al.* (1951). Uma combinação da reação do reagente de Folin-Ciocalteu com fenóis como a tirosina em proteínas fornece uma coloração azul escura intensa.

4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EPS

4.8.1 Hidrólise Ácida Total dos EPSs

A composição monossacarídica dos polissacarídeos foi determinada através da hidrólise ácida total de acordo com Stevenson e Furneaux (1991). Aproximadamente 2 mg da amostra de cada EPS foi tratado com 0.5 ml de TFA 2 M, por 1 h a 121 °C (YANG, GRAY E MONTGOMERY, 1999). O ácido foi removido por evaporação usando uma bomba de pressão reduzida seguida da redução da amostra utilizando NaBH_4 *overnight*, acetilação (anidrido acético, 120°C, 1,5 h) e lavagem com $\text{CHCl}_3/\text{NaHCO}_3$ aquoso (WOLFROM e THOMPSON, 1963). Os monossacarídeos na forma de acetatos de alditóis foram extraídos na fase clorofórmica e então analisados por GC-MS.

4.8.2 Métodos Cromatográficos

4.8.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Performance

O FPLC (*high-performance liquid chromatography*) utiliza uma coluna resistente à alta pressão que confere uma rápida separação de frações. 2 mL contendo aproximadamente 0,7 mg da amostra foi aplicada no aparelho para visualizar o perfil de distribuição de carboidratos por difração e proteínas por UV. O fluxo foi de 0,5 mL/min.

4.8.2.2 Cromatografia de Filtração em Gel

A cromatografia de filtração em gel é conhecida também como permeação em gel, cromatografia de exclusão ou em peneira molecular de difusão restrita. Esta técnica efetua a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A velocidade de deslocamento das moléculas pequenas é menor, pois estas precisam passar através do gel ou suporte. As moléculas grandes apresentam uma maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, emergindo mais rapidamente, promovendo a separação dos componentes de acordo com o peso molecular. As primeiras cromatografias de filtração em gel foram desenvolvidas em 260 mL de Sepharose CL-6B (7×10^4 a 4×10^7) preparada em uma coluna de 1,07 x 2,51 cm tendo como eluente água destilada. As últimas cromatografias foram realizadas em 180 mL de Sepharose 6B (1×10^4 a 4×10^6) do gel 89,5 x 1,6 cm com NaCl 1M como eluente.

O EPS liofilizado foi aplicado na coluna, o volume morto recolhido (~30 % do volume do gel) e desprezado. Utilizando um coletor de frações, pôde-se agrupar o volume total do gel, 3 a 5 mL/tubo.

4.8.2.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

Este método foi utilizado para quantificar acetatos de alditóis, identificados pelos tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons, comparados com padrões. As análises foram realizadas em um cromatógrafo

a gás VARIAN, modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 d.i.) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C/min e seguida de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C por min, até 230°C, mantendo-se constante. O gás hélio foi usado como gás de arraste.

4.8.2.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As amostras foram solubilizadas em água deuterada e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise à temperatura de 30°C ou 75°C. Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram determinados utilizando-se com padrão interno de acetona (30,3 ppm para carbono-13). Os espectros de ^{13}C -RMN foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 seg., sendo feitas, em média, 100 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 seg. entre os pulsos. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados.

4.9 OBSERVAÇÕES MORFO-ESTRUTURAIS DOS EPSs PARCIALMENTE PURIFICADOS

A técnica foi usada para observar a microestrutura de cada EPS em aumentos de 50 μm e 5 μm . As amostras foram colocadas em estabes, secas, recobertas de ouro e micrografadas.

4.10 ESTUDOS BIOLÓGICOS “*In Vivo*”

Os procedimentos para manipulação de cobaias e material biológico foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPR. Trabalhou-se com 4 diferentes grupos de animais: (GC) – grupo controle, aqueles que não receberam nenhum tipo de EPS; (GAg) – grupo *Agaricus*, aqueles que

receberam EPS, parcialmente purificado, de *A. brasiliensis*; (GB7) – grupo B7, que receberam EPS, parcialmente purificado, da bactéria láctica B7; (GAg+B7) – grupo *Agaricus* + B7, que receberam EPS, parcialmente purificado, do co-cultivo. E os experimentos foram divididos em três: O Experimento de número 1 (Exp.1), teve como objetivo avaliar os parâmetros bioquímicos frente à ingestão de ESP em cobaias saudáveis e o efeito indireto sobre a atividade de macrófagos peritoneais (realizado em duplicata); O Experimento de número 2 (Exp.2), avaliou parâmetros bioquímicos e atividade antitumoral em cobaias comprometidas com Sarcoma 180 frente à ingestão dos EPSs e o Experimento de número 3 (Exp.3) avaliou os parâmetros bioquímicos e atividade antitumoral pela aplicação direta dos EPSs solúveis na região intraperitoneal das cobaias comprometidas com Sarcoma 180.

4.10.1 Testes da Atividade Biológica dos EPSs

Camundongos albinos suíços fêmeas (*Mus musculus*), saudáveis, de 30 a 35 dias de idade, pesando entre 20 e 24 g. Os animais foram mantidos no Biotério da UFPR, com fotoperíodo de 12/12 horas, e temperatura controlada (23°C ±2°C). A alimentação e a água também foram controlados. O peso corporal foi monitoramento semanalmente. Os experimentos foram realizados em 3 condições distintas e dispostas conforme a tabela 4:

TABELA 4 - GRUPOS E TRATAMENTOS REALIZADOS NOS EXPERIMENTOS “*In Vivo*”

EXPERIMENTO	Nº DE COBIA/ GRUPO	ORAL	INTRAP.	DURAÇÃO	DOSE mg/Kg/d	GC	GAg	GB7	GAg+GB7
Exp.1	5	X	-	61 d	30				
RAÇÃO SEM EPS			-			X	-	-	-
RAÇÃO COM EPS			-			-	X	X	X
SARCOMA 180						-	-	-	-
Exp.2a	5	X	-	7 d	300				
RAÇÃO SEM EPS			-			X	-	-	-
RAÇÃO COM EPS			-			-	X	X	X
SARCOMA 180			-			X	X	X	X
Exp.2b	5			7 d	30				
SOLUÇÃO SALINA			X			X			
EPS			X				X	X	X
SARCOMA 180						X	X	X	X

GC: grupo controle; GAg: grupo que recebeu EPS do *A. brasiliensis*;

GB7: grupo que recebeu EPS da bactéria B7; GAg+B7: grupo que recebeu eps do Co-cultivo

4.10.2 Métodos Analíticos para os Experimentos *in Vivo*

4.10.2.1 Determinação do Número de Células Viáveis

Para a determinação do número de células, aplicou-se as equações descritas abaixo. Estes cálculos foram válidos para contagem de macrófagos, linfócitos e células tumorais.

Para a contagem das células, diluiu-se a suspensão celular 1:100 em tampão PBS, adicionou-se 50 µL desta suspensão celular em um eppendorf e mistura-se com 50 µL de azul de Trypan, homogeneizar e depositar na câmara de Neubauer. Contar os quatro quadrantes externos. De modo que o cálculo para o nº de cel/mL em suspensão = média das células x fator de diluição x fator da câmara: $M \times 200 \times 10^4$.

Para conhecer a viabilidade celular Utilizou-se a equação baseada em Phillips, 1973 citado por Dalla'Santa e Rubel, 2006:

$$CV(\%) = 100 \cdot \left(\frac{NC}{NC + C} \right)$$

Onde: CV = células viáveis; NC = células não coradas; C = células coradas pelo azul de Trypan. Feita a diluição, injetou-se $2,3 \times 10^7$ células na cavidade peritoneal de cada camundongo. Esta fórmula foi utilizada em todos os procedimentos que envolviam contagem de células viáveis.

4.10.2.2 Avaliação da Massa Corporal

A massa corporal foi determinada em balança analítica, diariamente tanto dos animais sadios (Exp.1) quanto dos comprometidos com Sarcoma 180 (Exp. 2 e 3).

4.10.3 Manutenção da Linhagem do Sarcoma 180

As células do Sarcoma 180 foram obtidas do estoque do Laboratório Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. Este tipo de sarcoma é muito utilizado para experimentos que envolvem atividade antitumoral devido à facilidade de manutenção e manipulação (ZUCKERBERG, 1972; SHIRAI *et al.*, 1991 citados por

DALLA'SANTA, 2006). As células foram enxertadas via intraperitoneal em camundongos, para formação de ascite. Todo o procedimento de manipulação para o repique *in vivo* foi realizado em condições estéreis. As células foram retiradas da região intraperitoneal das coibas e lavadas com 12 mL de PBS (Phosphate-Buffered Saline – tampão fosfato salina), pH 7,3 em tubos Falcons com capacidade para 15 mL; o tubo foi delicadamente homogeneizado e centrifugado 1.200 rpm, 5 minutos. Este passo foi repetido por até três vezes para eliminar fluido biológico. Em seguida as células foram diluídas em PBS e coradas para teste de viabilidade (segundo o item 4.13.2.1).

FIGURA 10 – PROCEDIMENTO DE RETIRADA DO LÍQUIDO ASCÍTICO EM CAMUNDONGO COMPROMETIDO COM SARCOMA 180 PARA REPIQUE DAS CÉLULAS TUMORAIS



4.10.4 Coleta de Sangue e Parâmetros Bioquímicos

O sangue foi obtido por exsanguinação e coletado com auxílio de funil e tubo de ensaio contendo gel de separação. Cada tubo conteve um pool de sangue de 3 e 2 camundongos. O tubo foi centrifugado a 3.500 rpm por 5-10 minutos para separação do soro pelo gel. As amostras foram encaminhadas para o Hospital de Clínicas (HC) da UFPR e analisadas por ensaio automático no aparelho ADVIA 1650 Bayer. Os parâmetros dosados foram: glicose, lipídeos totais, colesterol, VLDL, colesterol-HDL,

triacilgliceróis, proteínas totais e frações (albumina e globulinas), TGO, TGP, ácido úrico, uréia, creatinina.

4.10.2.5 Avaliação da Inibição Tumoral

Após sacrifício por exsanguinação, o líquido ascítico dos animais foi coletado, individualmente, com pipeta Pasteur plástica e dispensado em tubos Falcon de 15 mL. Para a contagem, trabalhou-se com 5 mL de cada amostra que foi devidamente lavada com PBS e centrifugada (1500 rpm, 5 min) por 2 vezes. O precipitado foi ressuspensão em 4 mL de PBS. O procedimento usado para contagem do número de células foi o mesmo das contagens anteriores. O resultado foi feito por comparação da média do número de células do grupo controle (GC) com a média dos demais grupos em estudo.

4.10.2.6 Processamento de Órgãos e Marcação das Células Imunológicas

Foram retirados e limpos os linfonodos axilares, baço e timo de cada camundongo e acondicionados em pool de 5, em tubos Falcons de 50 mL contendo 20 mL de PBS, fixados em suporte de isopor com gelo. Cada pool de órgãos foi macerado individualmente com auxílio do fundo chato de um êmbolo de seringa e PBS, centrifugado a 900 g por 10 min; o sobrenadante foi filtrado em intertela e lavado (a 1.200 rpm, 5 minutos), utilizou-se tampão de lise quando necessário. O pellet das células foram ressuspensão em 2 mL de tampão azida e realizada a contagem das células com objetivo de atingir uma concentração de 6×10^7 células/mL (COLIGAN *et al.*, 1992 citados por Dalla'Santa, 2006). As células foram marcadas com anticorpos conjugados com “Phycoerytrin” – PE para CD4 e CD8⁺, segundo recomendação do fabricante. Após marcação, as células foram lidas em 30.000 eventos em citômetro de fluxo.

4.10.3 Experimento 1

No Exp.1 trabalhou-se em duplicata com 5 animais por grupo. As cobaias sadias foram alimentadas com uma mistura de ração e EPS. Após os dois meses de alimentação, os camundongos foram exsanguinados e o sangue encaminhado para

avaliação dos parâmetros bioquímicos. Procedeu-se também a retirada dos macrófagos para avaliação da atividade fagocítica, retenção de lisossomos, produção de peróxido de hidrogênio e mensuração de ânion superóxido. Órgãos como baço, timo e linfonodo foram retirados e processados para obtenção das células imunológicas, marcação e leitura em citômetro de fluxo.

Utilizou-se a ração comercial NUVITAL composta por (carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos, aditivos antioxidantes). Pesou-se 6g de ração/dia/camundongo com adição de 30 mg/kg/dia/camundongo do EPS liofilizado, a mistura foi bem homogeneizada; água destilada foi usada para dar liga à ração farelada na proporção de 20 %. A alimentação durou até o fim de dois meses. A mistura foi distribuída em suportes de alumínio, levemente amassada e levada para estufa a 40°C por uma noite para que secasse, pois, uma ração compacta facilitaria a alimentação pelos roedores e evitaria maiores desperdícios. A ração foi preparada com no máximo 2 dias de antecedência da data de ingestão.

4.10.4 Experimento 2

No experimento 2 as condições de abrigo das cobaias foram as mesmas usadas no experimento 1. Houve monitoramento de peso, alimentação e água. A ração neste experimento conteve 300 mg de EPS/kg/d/camundongo e foi preparada nas mesmas condições do Exp.1.. Cada animal de cada grupo foi inoculado com 2 mL de uma suspensão de células tumorais numa concentração de $1,27 \times 10^7$ /mL. O grupo controle recebeu a mesma quantidade de ração, porém sem adição de EPS. Todos os dias as cobaias foram alimentadas. Após uma semana, as cobaias foram exanguinadas, os parâmetros bioquímicos avaliados, assim como atividade antitumoral determinada. Os órgãos foram processados e os linfócitos utilizados para marcação e leitura em citômetro de fluxo.

4.10.5 Experimento 3

No experimento 3 as condições de abrigo das cobaias foram as mesmas usadas no experimento 1 e 2. Houve monitoramento de peso, alimentação e água. Cada animal de cada grupo foi inoculado com 2 mL de uma suspensão de células tumorais numa concentração de $1,27 \times 10^7/\text{mL}$. As cobais não foram alimentadas com EPS; uma suspensão de 2 mL contendo 30 mg de EPS/kg/d/camundongo foi preparada e introduzida na cavidade peritoneal da cada cobaia todos os dias ao longo de 1 semana. O grupo controle (GC) recebeu o mesmo volume em solução salina 0,85 % na cavidade peritoneal. Após o período de tratamento, as cobaias foram exanguinada, os parâmetros bioquímicos avaliados, assim como atividade antitumoral; os órgãos foram processados e os linfócitos utilizados para marcação e eleitura em citômetro de fluxo.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados das cinéticas de produção de *A. brasiliensis* e da BAL foram realizados em triplicata. Os dados relativos à inibição tumoral foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o delineamento inteiramente ao acaso.

O teste de Tukey foi aplicado para verificar interação e correlação entre as variáveis estudadas (dosagem de EPS x imunomodulação, tumor e parâmetros bioquímicos). Os resultados foram reportados na forma de média e desvio padrão, considerando o nível de significância de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA LÁTICA

O API 50 CHL é um kit que permite o estudo da fermentação de 49 açúcares. A galeria é constituída por 50 microtubos para o estudo da fermentação de substratos, pertencentes à família dos hidratos de carbono e derivados (heterosídeos, polialcóois, ácidos urônicos). As leituras foram feitas em 24 e 48 horas, após o inóculo. Todos os resultados foram apresentados como positivo (+), negativo (-) ou duvidoso (\pm) conforme a Tabela 5.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO E RESULTADO DA GALERIA API 50 CHL

TIRA 1-9

TUBO	TESTE	COMPONENTE ATIVO	24h	48h
0		CONTROLE	—	—
1	GLY	GLIcerol	—	—
2	ERY	ERItritol	—	—
3	DARA	D-ARAbinose	—	—
4	LARA	L-ARAbinose	—	—
5	RIB	D-RIose	+	+
6	DXYL	D-XILOse	—	—
7	LXYL	L- XILOse	—	—
8	ADO	D-ADOntol	—	+
9	MDX	Metil- β -D-Xilopiranosído	—	—

TIRA 10 -19

TUBO	TESTE	COMPONENTE ATIVO	24h	48h
10	GAL	D-GALactose	+	+
11	GLU	D-GLUcose	+	+
12	FRU	D-FRUtose	+	+
13	MNE	D-MaNosE	+	+
14	SBE	L-SorBosE	+	+
15	RHA	L-RAMnose	—	—
16	DUL	DULcitol	—	—
17	INO	INOsitol	—	+
18	MAN	D-MANITOL	+	+

19	SOR	D-SORbitol	+	+
----	-----	------------	---	---

TIRA 20-29

TUBO	TESTE	COMPONENTE ATIVO	24h	48h
20	MDM	Metil- α -D-Manopiranosido	–	–
21	MDG	Metil- α -D-Glucopiranosido	\pm	\pm
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	+	+
23	AMY	AMIdalina	\pm	+
24	ARB	ARButina	\pm	+
25	ESC	ESCulina (Citrato de ferro)	+	+
26	SAL	SALicina	+	+
27	CEL	D-CELOBiose	+	+
28	MAL	D-MALtose	\pm	+
29	LAC	D-LACTose (origem bovina)	+	+

TIRAS 30-39

TUBO	TESTE	COMPONENTE ATIVO	24h	48h
30	MEL	D-MELibiose	–	–
31	SAC	D-SACarose	\pm	+
32	TRE	D-TREalose	+	+
33	INU	INulina	–	–
34	MLZ	D-MeLeZitose	–	–
35	RAF	D-RAFinose	–	–
36	AMD	AmiDo	–	–
37	GLYG	GLIcoGênio	–	–
38	XLT	XiLiTol	–	–
39	GEN	GENTIobiose	\pm	+

TIRAS 40-49

TUBO	TESTE	COMPONENTE ATIVO	24h	48h
40	TUR	D-TURanose	+	+
41	LYX	D-XILOse	–	–
42	TAG	D-TAGatose	+	+
43	DFUC	D-FUCose	–	–
44	LFUC	L-FUCose	–	–
45	DARL	D-ARabitoL	–	–
46	LARL	L-ARabitoL	–	–
47	GNT	GlucONaTo de potássio	\pm	\pm
48	2KG	2-CetoGluconato de potássio	–	–
49	5KG	5-CetoGluconato de potássio	–	+

O resultado da tabela acima foi editado no programa APILAB PLUS versão 5.1 (BioMérieux, França) para identificação da cepa. A bactéria estudada foi caracterizada

de acordo com este perfil como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* tipo 1 com 89 % de certeza.

5.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

5.2.1 *Agaricus brasiliensis*

O cultivo de *A. brasiliensis* foi avaliado conforme a imagem de microscopia óptica (Figura 11), pode-se observar as hifas do fungo em cultivo submerso (aumentos de 10 e 40 x). A cinética de produção de EPS, biomassa, aproveitamento de carboidrato e comportamento do pH também foram observados.

FIGURA 11- IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE HIFAS DE MICÉLIO DE *A. brasiliensis* EM CULTIVO SUBMERSO



Aumento de 10 x

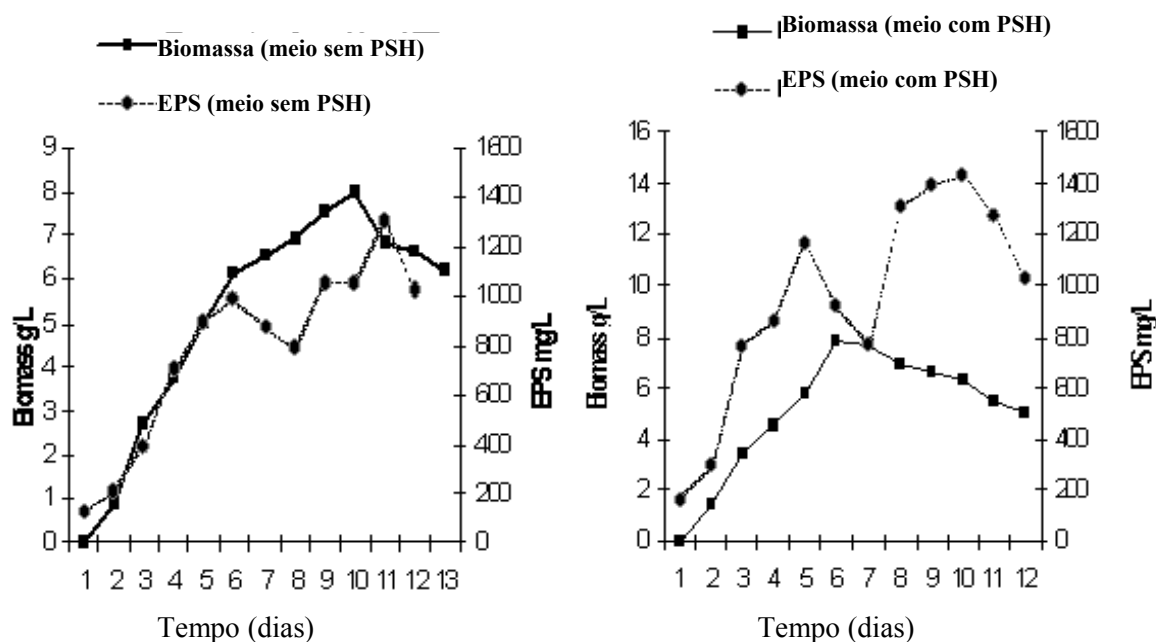
Aumento de 40 x

5.2.1.1 Produção de Biomassa e Exopolissacarídeo por *Agaricus brasiliensis*

A adição da proteína de soja hidrolisada (PSH) ao meio de cultivo teve como objetivo incrementar a produção de biomassa e de EPS pelo basidiomiceto. A Figura 12 mostra os tempos de fermentação ótimos para os cultivos de *A. brasiliensis* nos diferentes meios estudados. O crescimento dos microrganismos foi acompanhado por cinéticas em triplicata. O meio contendo fonte adicional de peptídeos e aminoácidos livres provenientes da PSH antecipou em até 5 dias a máxima produção da biomassa

pelo fungo que foi de 7,88 g/L, e a média de produção igual a $5,07 \pm 2,33$. No meio FAN simples, sem PSH, a máxima produção ocorreu no 10º dia com uma biomassa equivalente a 8,34 g/L e uma média de produção de $5,19 \pm 2,59$. De acordo com estes dados, não houve diferença significativa na máxima produção para ambos os meios a um intervalo de confiança de 95 % ($p > 0.05$). Porém, quando o objetivo é produzir biomassa em grandes quantidades, tem-se como vantagem a redução do tempo de fermentação para o *A. brasiliensis* em até 5 dias, o que significa uma redução de custo e tempo para a indústria e justifica o uso da PSH como substrato.

FIGURA 12 - INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA NO MEIO FERMENTATIVO PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EPS PELO *A. brasiliensis*.



O meio de cultivo com PSH apresentou significativo incremento na produção de exopolissacarídeo: uma produção máxima de 1.161,5 mg/L no 5º dia foi obtido para o meio suplementado, enquanto a produção no 5º dia para o meio sem HPS foi de 800 mg/L, o que veio a aumentar para uma máxima de 993,5 mg/L no 6º dia, seguida de redução. A produtividade para o meio com PSH de EPS foi de $886,1 \pm 99,9$ e para o meio sem PSH foi de $669,1 \pm 81,8$.

A otimização da produção de biomassa é de grande interesse comercial, já que o *A. brasiliensis* tem sido aplicado na culinária como um alimento nutracêutico e funcional. A composição química e os compostos que determinam o sabor presente no fungo conferem boa aceitabilidade aos produtos alimentícios a base deste cogumelo (STIJVE *et al.*, 2002). Sua biomassa tem um gosto levemente adocicado pela presença de aminoácidos como alanina e açúcares totais, que mascaram a presença dos ácidos aspártico e glutâmico, responsáveis pelo gosto amargo (CHANG *et al.*, 2001). Além da atrativa composição nutricional rica em minerais e vitaminas, possui também fibras que facilitam a digestão. A ingestão da biomassa por camundongos, produzida tanto em fermentação submersa quanto em estado sólido, relatam atividade antitumoral frente ao sarcoma 180 (EBINA e FUJIMIYA, 1998; ITO *et al.*, 1997; MIZUNO *et al.*, 1999; TAKUKA, KIMURA e OKUDA, 2001).

A Tabela 6 mostra o efeito positivo da PSH sobre a produção de biomassa e exopolissacarídeo pelo *A. brasiliensis*. A partir deste ensaio todos os demais foram padronizados, principalmente, para o tempo de extração do biopolímero.

TABELA 6 – PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EPS POR *A. brasiliensis* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

PARÂMETROS CINÉTICOS	MEIO SEM PSH	MEIO COM PSH
Máxima taxa de crescimento específico (μ_m), h ⁻¹	0,0112	0,0105
Máxima concentração de biomassa, g/L	8,30 ± 0,02	7,80 ± 0,01
Máxima concentração de EPS, g/L	1430,70 ± 26,75	993,50 ± 0,20
Coefficiente de produção de biomassa ($Y_{x/s}$) ^a	0,55	0,56
Conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) ^b	0,10	0,07
Máxima produtividade (R_m) ^c	0,0112	0,0229

^a Gramas biomassa por grama de glicose; ^b Gramas de EPS por grama de glicose; ^c Gramas de EPS por litro por hora

Leifa *et al.* (2005) utilizando um meio simples com aeração e agitação controlados em biorreator, cuja fonte de carbono foi de 1 %, sua produção foi de 321,2 mg/L. Na cinética de crescimento, a quantidade de EPS alcançou o seu pico (8,634 mg/50 mL) no 8º dia e permaneceu até o 12º dia de fermentação. Tal fato mostrou que a fermentação deveria ser interrompida antes do 10º dia de cultivo. Gern (2005),

obteve uma produção de 1235.96 mg/L de EPS em condições controladas de agitação, aeração 2.00 vvm e pH 7,0 em fermentador de 2 L no mesmo meio e cultivo utilizado neste trabalho.

Shu e Chu (2007) suplementaram o cultivo para *A. brasiliensis* com diferentes fontes de carbono, concentrações de KH_2PO_4 e vitamina B1. Como resultado, os pesquisadores alegaram que tais componentes afetam a produção de exopolissacarídeo (ABEP), bem como sua atividade biológica e distribuição da massa molecular de ABEP. A relação de conteúdo β -(1 \rightarrow 3)-glicana no ABEP mostrou forte correlação com sua atividade biológica e com a massa molecular média do EPS. A média para a otimização da fermentação deu um aumento de 1,35 vezes na produção de EPS com aumento de 1,51 vezes a sua atividade biológica. A fermentação foi realizada em um biorreator de coluna. Estes resultados fornecem informações valiosas para otimização da produção de polissacarídeos bioativos de *A. brasiliensis* em cultivo submerso.

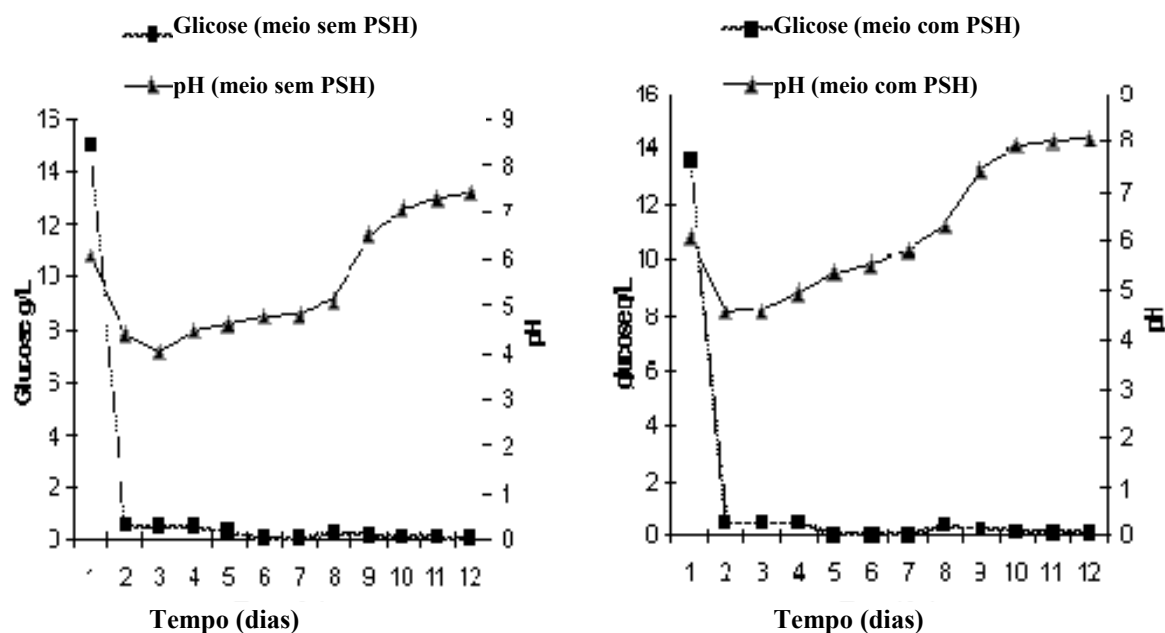
Kim *et al.* (2005), informou um estudo com DOC (concentração de oxigênio dissolvido) controlado em culturas de *A. blazei*. Eles mudaram a velocidade de agitação e a taxa de aeração para manter um DOC constante e controlado acima de 20 % com uma velocidade de agitação de 100-450 rpm, conseguiram uma produção de EPS de 5,7 g/L mais que o dobro que quando o DOC não era controlado. Em 2002, os mesmos autores publicaram um estudo sobre a produção de EPS e o crescimento micelial de *Paecilomyces sinclairii* em fermentação submersa, testando diferentes fontes minerais. Foram alcançados o máximo crescimento micelial e produção de EPS quando o potássio foi adicionado ao meio, seguido por manganês e ferro. Jhonathan e Fasidi (2001) mostraram que o Mg e Zn foram os melhores minerais para a produção de EPS e biomassa *Porentinus subnudus*. Em 2004, Kim e colaboradores informaram um estudo sobre fontes minerais em cultivo de *A. blazei* para produção de EPS. Um notável aumento de EPS (500 mg/L) foi observado quando ele somou Mn ao meio. O zinco e o Ferro também apresentam um efeito importante na produção de EPS (100 mg/L). O pH do caldo de fermentação foi também um dos fatores chave para biomassa e produção de metabólitos pelos microrganismos. O controle do pH tem uma grande influência na formação de EPS microbiano (YANG e LIAU, 1998).

5.2.1.2 Consumo do Substrato e pH Durante a Fermentação de *A. brasiliensis*

A fonte de carbono para o meio sem e com PSH limitou-se no 3º dia de fermentação, sem diferenças significativas ($p > 0,01$). A redução da fonte de açúcar no meio é paralela a uma leve alcalinização do pH (Figura 13). É possível que o fungo degrade seu próprio EPS como fonte de carbono. O consumo médio para o meio sem PSH foi de $29,95 \pm 0,23$ e para o uso de meio utilizando proteína de soja foi de $24,81 \pm 0,23$. O uso da PSH teve influência sobre o pH em 14,23 %, comparado ao meio FAN sem HPS. O aumento tornou-se relevante considerando o desenvolvimento micelial e a produção de EPS pelo fungo (Figura 12).

Chin-Hang, Ko-J. e Bor-Jiun (2004), estudaram os efeitos do pH da cultura na produção e na distribuição de peso molecular do polissacarídeo bioativo produzido por *A. blazei*. Eles avaliaram quatro cultivos com diferentes pHs. Como o pH de cultura de cada grupo era controlado de 4.0 a 7.0, a máxima produção de EPS aumentou de 561 a 1252 mg/L, mas o peso molecular diminuiu notoriamente de 1080 kDa para 600 kDa. Kim *et al.* (2004) também estudou o controle de pH igual a 5.0 em cultivo submerso de *A. blazei*, no qual as máximas produções alcançadas de EPS foi 3.69 g/L e biomassa de 7.38 g/L

FIGURA 13 – DOSAGEM DE GLICOSE E COMPORTAMENTO DE pH DURANTE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE *A. brasiliensis* EM MEIO SEM E COM PSH



Lin e Yang (2005), acompanharam o crescimento micelial de *A. blazei* Murril em diferentes pHs e otimizaram a produção de EPS em pH inicial de 6,2. Fan *et al.* (2002), também conseguiram otimizar a produção da biomassa e de exopolissacarídeo pelo *A. brasiliensis* em fermentação submersa com pH inicial 6,0 (± 2), o qual foi utilizado neste trabalho.

5.2.1.3 Relação Proteína/Carboidrato no Exopolissacarídeo de *A. brasiliensis*

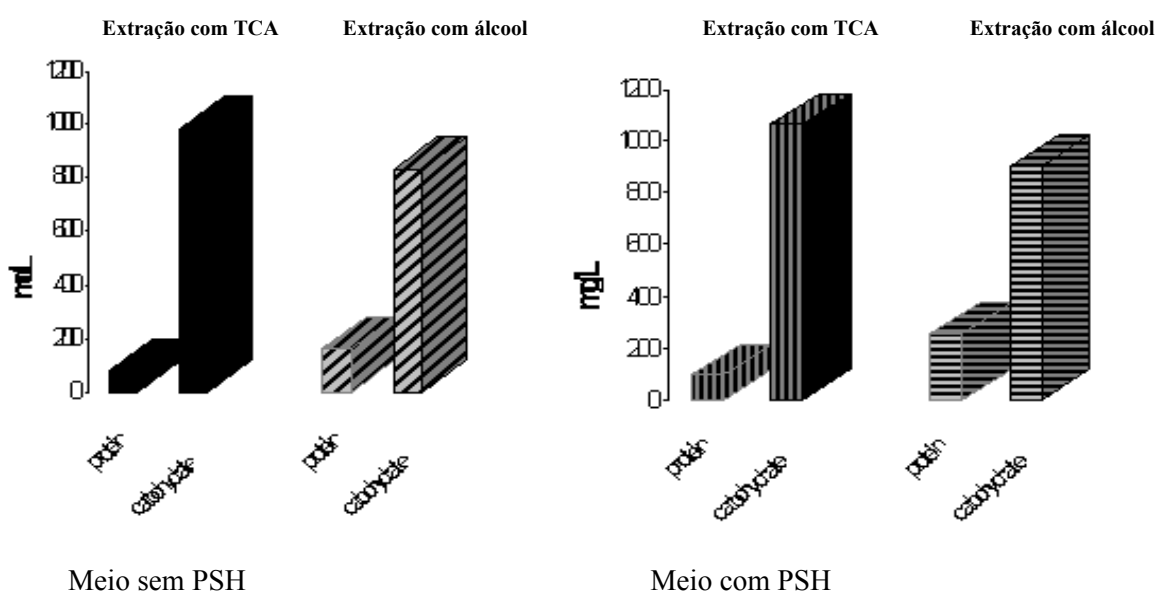
Quanto à concentração de proteínas presentes no EPS parcialmente purificado, a extração prévia por TCA forneceu uma relação carboidrato:proteína, em percentagem, correspondente a 92:0,8 enquanto que na extração somente com álcool esta relação foi de 77,5:22,5 (Figura 14). Existiu uma diferença significativa a 95 % de significância entre os diferentes métodos de extração ($p < 0.05$). Isto confirma a presença de um complexo glicano-proteína.

Os resultados obtidos pela extração com TCA concordam com o trabalho desenvolvido por Lin & Yang (2006), que precipitaram proteínas do meio com ácido 5-sulfossalicílico, obtendo um conteúdo de proteína no EPS purificado entre $1,63 \pm 0,05$ % e nenhuma, e um total de carboidratos de $82,27 \pm 0,99$ a $92,14 \pm 0,74$ %. Já a

extração em sucessivas precipitações em etanol conferiu resultados próximos ao estudo realizado por Dong *et al.* (2002), que obtiveram uma concentração de 21,6 % de proteínas e 57,5 % de carboidrato no EPS de *A. brasiliensis*.

Os resultados mostram que o uso de TCA favoreceu a purificação do EPS, visto que reduziu a quantidade de proteínas precipitantes do meio de cultivo junto com o EPS.

FIGURA 14 – RELAÇÃO CARBOIDRATO:PROTEÍNA PRESENTE NO EPS DE *A. brasiliensis* EM DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO EM MEIO SEM E COM PSH

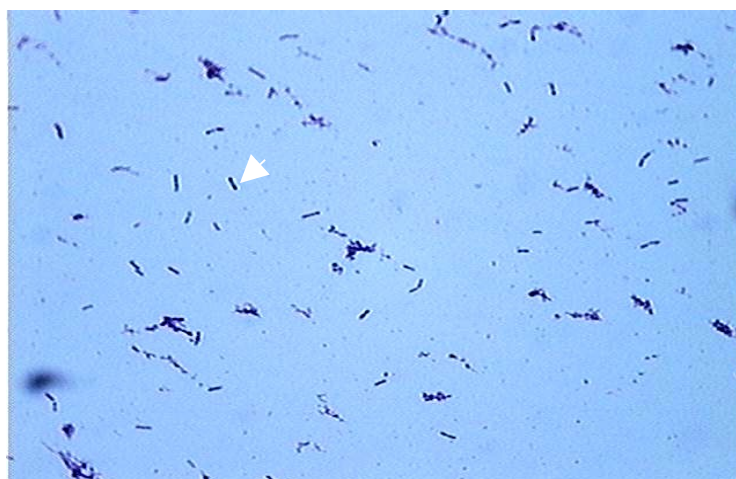


5.2.2 *Lactobacillus paracasei*

Muitos estudos mostram que a produção de EPS por lactobacilos está fortemente ligada aos níveis de biomassa (De VUYST *et al.*, 1998; TORINO *et al.* 2000 citados por CHAMPAGNER, GADNER e LACROIX, 2007) e que a viscosidade nem sempre está relacionada à produção de EPS (SHIHATA e SHAH, 2002 citados por CHAMPAGNER, GADNER e LACROIX, 2007; RUAS-MADIEDO *et al.* 2005). O meio selecionado (M4) para a fermentação da B7 continha todos os nutrientes necessários para um bom desenvolvimento da bactéria láctica além, de peptídeos e aminoácidos livres provenientes da PSH. O cultivo do *Lb. paracasei* mostrou uma alta produção de biomassa bacteriana, no entanto, a viscosidade no meio fermentativo foi

baixa. A Figura 15 mostra imagem microscópica da bactéria em aumento de 100 x após coloração de Gram. As células foram coradas de Gram-positivas em forma de *Bacillus* curvos com extremidades arredondadas.

FIGURA 15 – IMAGEM EM MICROSCOPIA ÓPTICA DA BACTÉRIA LÁTICA (B7) EM AUMENTO DE 100 X

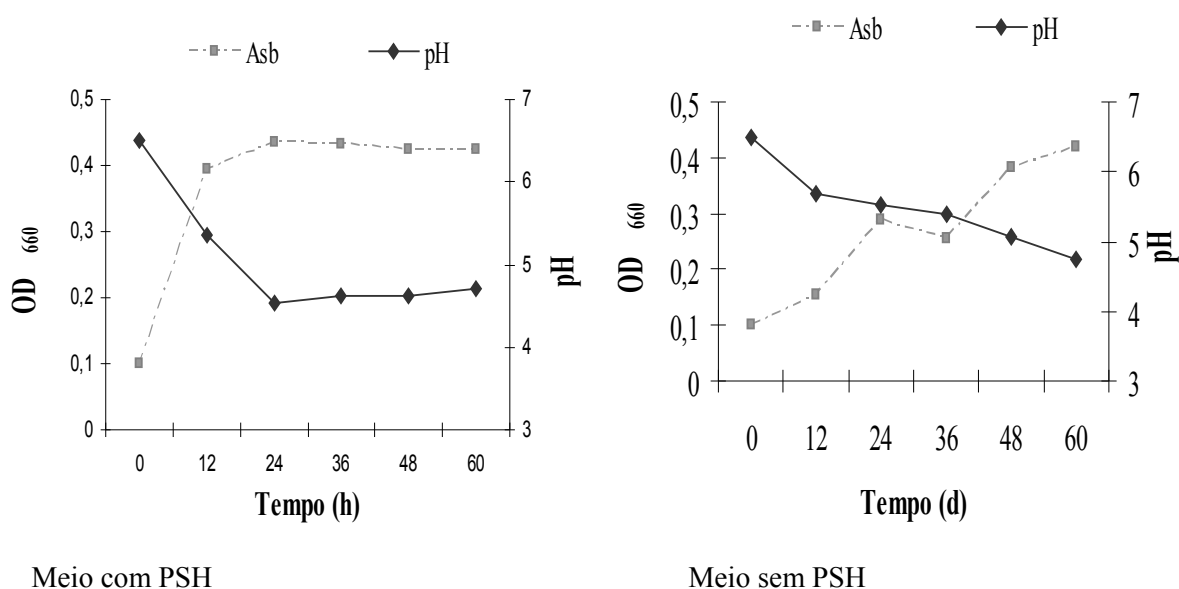


5.2.2.1 Produção de Biomassa e Perfil do Cultivo do *Lactobacillus paracasei*

A produção de EPS em meio M4, com PSH foi comparada ao meio sem PSH. A Figura 16 mostra o crescimento da bactéria láctica por OD₆₆₀ e o comportamento do pH em meio com e sem PSH (Figura 16) a 37°C. O objetivo foi verificar a influência da PSH sobre o desenvolvimento celular da bactéria. A fermentação com PSH incrementou a produção de biomassa pela bactéria até às 24 h, após este período, o microrganismo entrou na fase estacionária e declínio; é possível observar que, no momento de maior produção da biomassa, o pH do meio alcançou níveis mais ácidos 4,5 ($\pm 0,3$). Os dados para a fermentação no meio com PSH foi significativamente diferente dos dados da fermentação sem PSH ($p < 0,001$), onde até às 48-60 h a bactéria ainda estava em fase de crescimento exponencial e o pH foi mais ácido após às 48 h ($4,75 \pm 0,1$). Os resultados revelam que o meio M4 contendo PSH efeito positivo sobre a produção de biomassa pela bactéria, conseqüentemente, poderá aumentar os níveis de produção de EPS por esta. Este comportamento pode ser

explicado pelo fato de que os nutrientes da PSH foram facilmente assimilados pela bactéria.

FIGURA 16 – CRESCIMENTO BACTERIANO E pH DURANTE A FERMENTAÇÃO DE B7 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO



Este substrato pode ter impacto na produção de biomassa de outras espécies de bactérias lácticas comercialmente promissoras, podendo ser adicionado ao substrato a ser fermentado, exemplo, leites ou outros tipos de produtos lácticos, visto que se trata de um substrato de origem vegetal e bastante consumido pelo homem (soja). O peso seco da biomassa bacteriana no meio com PSH foi maior às 24 h alcançando 12,2 mg/L (Figura 16). Sabendo que a produção de biomassa bacteriana está ligada à produção de EPS, o meio M4 contendo PSH foi padronizado durante o experimento para fermentação da bactéria em estudo.

Vários estudos têm mostrado a influência do pH e da concentração de substrato no metabolismo das bactérias lácticas. O pH pode afetar diretamente o padrão fermentativo das bactérias lácticas e varia com a espécie. Por exemplo, o *Lb. bulgaricus* é homofermentativo em condições ácidas, mas torna-se heterofermentativo em condições alcalinas (RHEE e PACH, 1980). Por outro lado, o *Lb. plantarum* produz mais ácido lático e menos acetoína em altos valores de pH (TSENG e

MONTVILLE, 1990), o mesmo vale para o crescimento da biomassa. Enquanto o *Lb. manihotivorans* produz mais ácido láctico a partir de amido quando o pH é controlado em 6,0 (GUYOT *et al.*, 2000). Assim, a rota homo ou heterofermentativa das bactérias lácticas pode ser alterada por mudanças no pH do meio (LIU, 2003).

5.2.2.2 Produção de EPS pelo *Lactobacillus paracasei* em meio com PSH

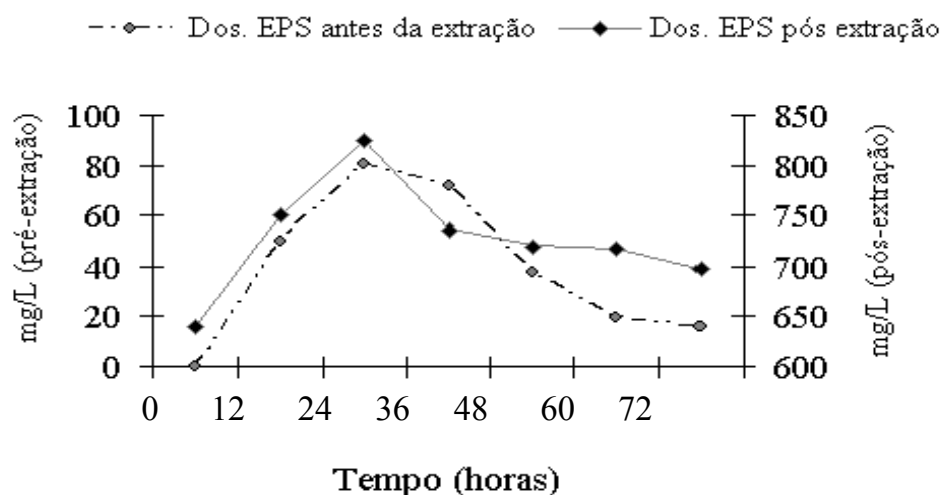
A figura 17 mostra a quantificação de EPS obtida por fenol-sulfúrico, antes e após extração do exopolissacarídeo do meio de cultivo. A dosagem antes da extração mostrou uma produção máxima de $80,2 \pm 6,9$ mg/L de EPS às 24 h; após a extração do EPS do meio de cultivo, a quantidade de EPS máxima foi equivalente a 825 ± 91 mg/L, uma diferença significativa ($p < 0,0001$) (figura 17). A quantidade inicial de açúcares totais no meio com PSH foi de aproximadamente 720 mg/L maior em relação ao meio sem PSH. Estes intrigantes resultados só puderam ser esclarecidos após a caracterização parcial do EPS da bactéria láctica (item 5.3) e será explicado posteriormente.

Não foi possível detectar produção significativa de EPS pela bactéria B7 em meio de cultivo sem a presença da PSH, mesmo tentando aumentar a fonte de nitrogênio dobrando a concentração de extrato de levedura do meio. Este resultado concorda com Kojic *et al.* (1992) e Cerning *et al.* (1994), que trabalharam com *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGCG11, isolado de queijo branco caseiro semi-rígido (fabricados na aldeia Adrovici, Montenegro), demonstraram que a síntese de EPS é diretamente dependente da fonte de carbono em um meio rico basal mínimo, pois na presença de frutose, a produção de EPS era totalmente desfavorecida. Tal fato leva a afirmar que a PSH pode conter substâncias essenciais para a assimilação e produção do EPS pela bactéria.

Quanto à concentração de EPS alcançada neste experimento (80,2 mg/L, às 24 h), pode-se afirmar que se conseguiu uma alta concentração em pouco tempo. Visto que, Perty *et al* (2000), a partir da fermentação de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 1187 em um meio semi-sintético, obtiveram uma máxima produção de 40 mg de EPS/L após 72 horas. Vaininkelgem *et al* (2003) alcançaram valores correspondente

entre 20-100 mg/L para produção de EPS por *Streptococcus thermophilus*. A produção de EPS pelo *Lb paracasei* ainda é pouco estudado, portanto não existe referência de quantos mg/L de EPS esta espécie costuma produzir.

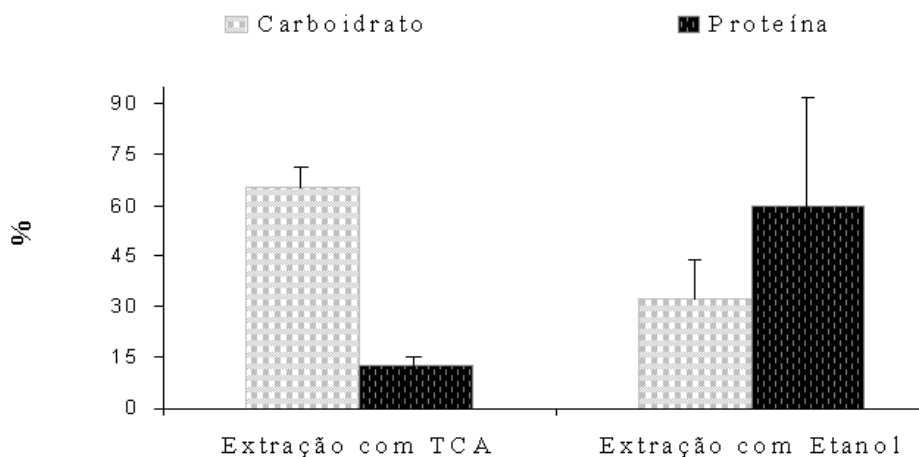
FIGURA 17 – DOSAGEM DE EPS PRODUZIDO POR *Lb paracasei* ANTES E APÓS EXTRAÇÃO DO CALDO FERMENTADO



5.2.2.3 Relação Carboidrato:Proteína no EPS de *Lb paracasei*

Quanto à quantificação de proteínas presente no EPS precipitado do cultivo da bactéria, encontramos uma relação de 65:13, em porcentagem, quando a extração foi previamente tratada com TCA; para a precipitação de EPS somente com etanol, estes valores passaram para 32:60, uma diferença significativa ao intervalo de 95 % de confiança (Figura 18). A extração somente com álcool precipita também proteínas provenientes do meio de cultivo, o que dificulta a purificação do EPS. A relação carboidrato:proteína encontrada na extração com TCA neste trabalho é similar aos resultados obtidos por Kojic *et al.* (1992) e Cerning *et al.* (1994) que, trabalharam com *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGCG11, e isolaram um heteropolissacarídeo neutro constituído predominantemente de glicose (cerca de 75 %) e ramnose (cerca de 15 %).

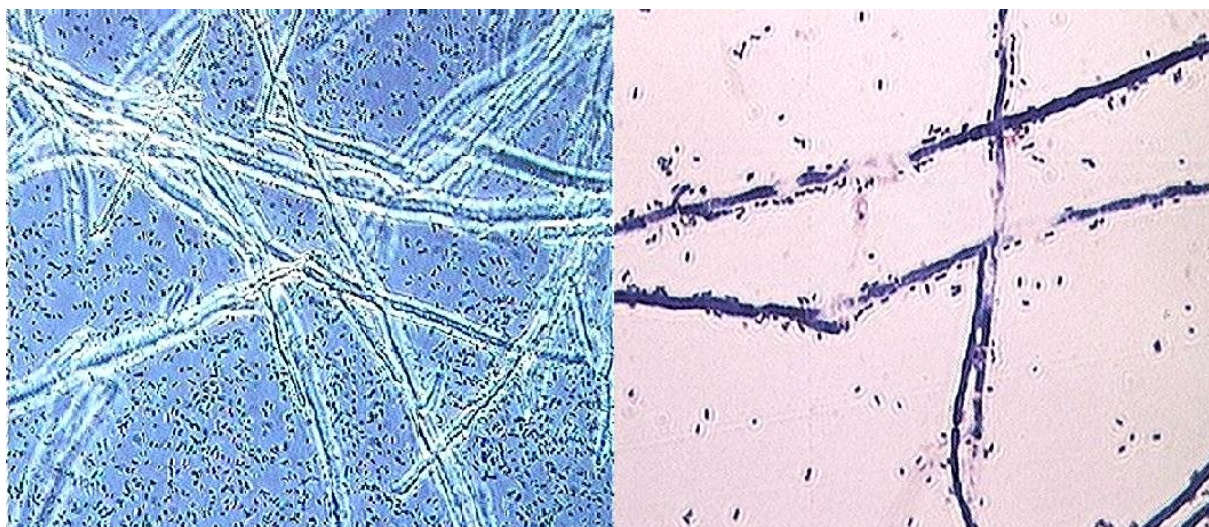
FIGURA 18 – RELAÇÃO CARBOIDRATO PROTEÍNA PRESENTE NO EPS DA BACTÉRIA POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO



5.2.3 Co-cultivo de *A. brasiliensis* e *Lactobacillus paracasei*

Durante o co-cultivo foi possível observar que ambos microrganismos apresentaram níveis de crescimento consideráveis. A figura 19 mostra imagens por microscopia óptica em aumentos de 100 x de uma co-cultura (fungo com bactéria) após 2 dias de fermentação. A imagem corada (à direita) é possível observar degradação de hifas do *A. brasiliensis* pelas bactérias. Tal degradação poderia facilitar a liberação de intrapolissacarídeos (IPS) presentes nas hifas e aumentar a concentração de EPS extraída do co-cultura. O estado de estresse pelo micélio, devido à fermentação pelas bactérias poderia gerar também um novo metabólito, pois, este fator está relacionado com a produção ou não de metabólitos secundário por microrganismos. No entanto, nenhuma destas hipóteses pode ser observada. A primeira foi contradita após observação de que o co-cultivo produz uma quantidade de EPS significativamente menor que a fermentação isolada do fungo; a segunda hipótese será esclarecida na discussão sobre a caracterização parcial dos EPSs.

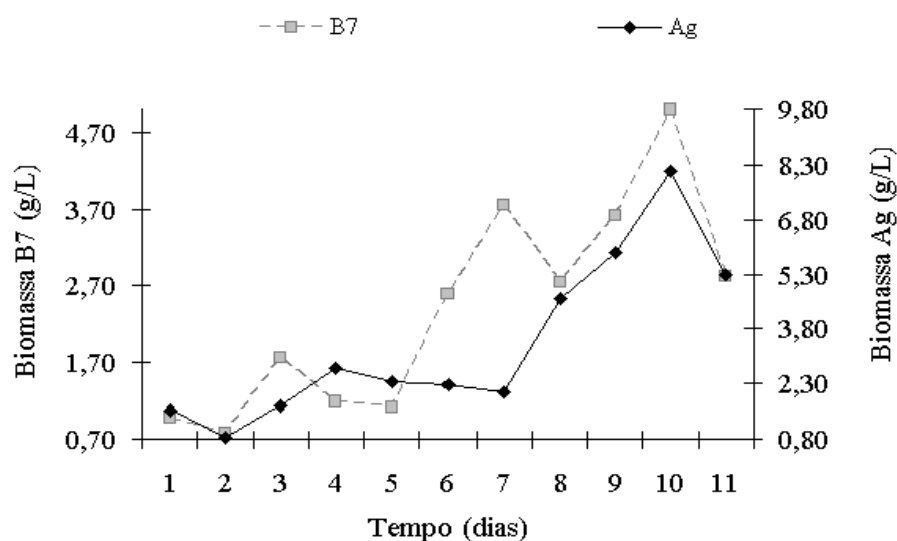
FIGURA 19 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DO CO-CULTIVO EM AUMENTO DE 100 x



5.2.3.1 Produção Biomassa e EPS pelo Co-cultivo

A produção de biomassa pelos microrganismos em co-cultivo foi maior que os cultivos isolados de cada um deles. A máxima produção da biomassa do fungo foi equivalente a $8,14 \pm 0,03$ g/L, no décimo dia; já a biomassa da bactéria B7 foi de $4,99 \pm 0,1$ g/L, alcançada também no décimo dia, após este período, seguiu-se um declínio para a produção de ambos gêneros. No entanto, o tempo para a máxima produção foi mais longo que a produção isolada. O fungo *A. brasiliensis* quando fermentado isoladamente produziu no quinto dia uma concentração micelial de 7,88 g/L e a máxima produção celular pela bactéria láctica foi no período de 24 h. A figura 20 mostra a relação entre a produção de biomassa e o tempo para o co-cultivo dos microrganismos.

FIGURA 20 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA BIOMASSA BACTERIANA E FÚNGICA DURANTE O CO-CULTIVO



3.2.3.2 Produção de EPS pelo Co-cultivo

A produção de EPS pelo co-cultivo foi significativamente menor que a produção de EPS durante o co-cultivo. Uma redução de $37,6 \pm 2,3$ %, cujos valores foram de aproximadamente 1450 mg/L no 5º dia de fermentação para o *A. brasiliensis* e de 890 mg/L no 6ª dia para o co-cultivo (Figuras 12 e 21). No entanto, esta produção foi consideravelmente maior que a produção de EPS da bactéria à significância de 95 %. Logo, pode-se afirmar que única maneira de justificar a viabilidade da produção em co-cultivo é a possibilidade de o EPS produzido tratar-se de um biopolímero novo, diferente dos EPSs produzidos pelos gêneros fermentados isoladamente; ou que o potencial biológico dele seja maior que a atividade dos EPSs produzidos pela bactéria e fungo isoladamente.

FIGURA 21 – PRODUÇÃO DE EPS PELO CO-CULTIVO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

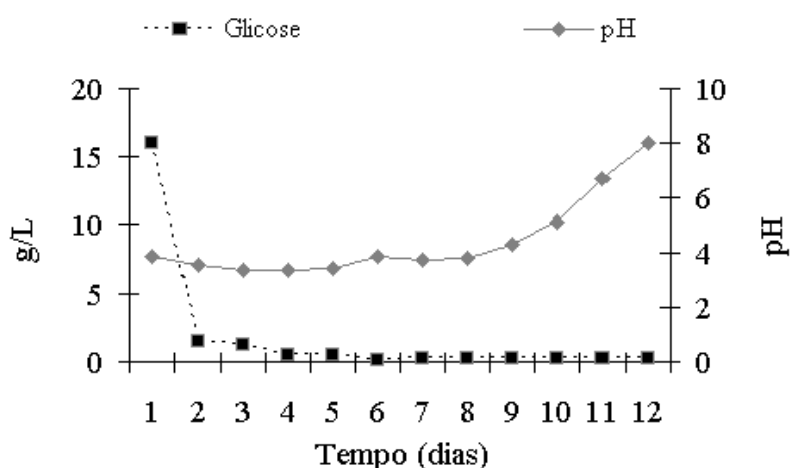
5.2.3.3 Consumo de Glicose e Evolução do pH Durante o Co-cultivo

Para o consumo de glicose não houve alteração entre o co-cultivo e a fermentação de *A. brasiliensis* a 95 % de confiança ($p > 0,05$), porém o comportamento do pH foi bem diferente: o início da fermentação para o cultivo isolado o pH foi de 4,5 até o 3º dia seguido de alcalinização, no co-cultivo o pH manteve-se em $3,6 \pm 0,2$ até o 8º dia de fermentação, tornando-se alcalino (pH 8,02). Esta alcalinização é paralela a máxima produção de biomassa e EPS pelo co-cultivo.

O pH de uma fermentação líquida é o fator chave para a produção da biomassa e de metabólitos secundários por um microrganismo. Seu controle possui grande influência na formação dos exopolissacarídeos microbianos (Yang e Liao, 1998). Gern, (2005) após controlar o pH de uma fermentação de *A. brasiliensis* em biorreator conseguiu maximizar a produção da biomassa e de EPS pelo fungo. Chin-Hang *et al.* (2004), estudaram os efeitos do pH do meio na produção na distribuição do peso molecular de exopolissacarídeos. Os pHs foram controlados entre os valores de 4.0 a 7.0, o que aumentou a produção de exopolissacarídeo de 561 para 1.252 mg /L, no entanto, houve um decréscimo na média do peso molecular de 1080 kDa para 600 kDa dos EPS. Sabe-se que a atividade biológica dos polissacarídeos está relacionada a sua solubilidade, tamanho, configuração estrutural e espacial. Quanto maior o polissacarídeo, maior seu poder de ativação, conseqüentemente, maior a atividade imunomoduladora (SHU, WEN e LIN, 2003). Referências citadas em discussões no item 5.2.1.2 relatam que o controle da fonte de carbono e do pH ajudam a otimizar a

produção de Biomassa e EPS. Urge a necessidade de avaliar e conduzir novos experimentos envolvendo o controle estes parâmetros.

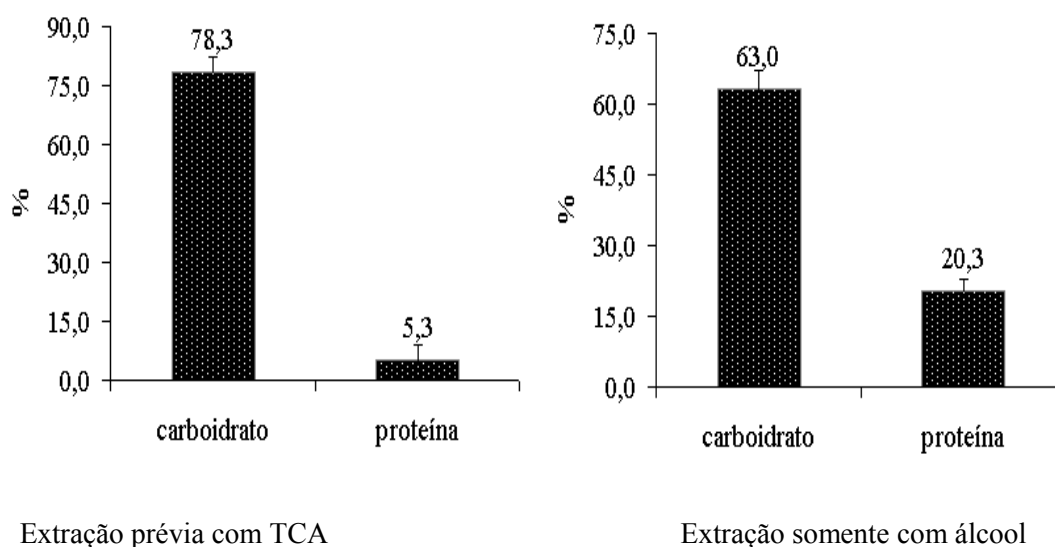
FIGURA 22 – CONSUMO DE SUBSTRATO E pH DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CO-CULTIVO



5.2.3.4 Relação Carboidrato:Proteína no EPS Isolado do Co-cultivo

A relação carboidrato:proteína para a extração somente com etanol no EPS isolado do co-cultivo foi semelhante aos valores encontrados no EPS de *A. basiliensis*: a extração prévia com TCA seguida por etanol deu uma relação de $78,3 \pm 3,8:5,3 \pm 3,9$ e para a extração somente com álcool a relação foi de $63 \pm 4:20,3 \pm 2,5$ (Figura 23). Houve uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre a percentagem de carboidratos e proteínas obtidos entre os métodos utilizados. Porém, nenhuma referência de percentagens de carboidrato e proteína foi encontrada quando o EPS era isolado de um co-cultivo, principalmente de gêneros diferentes.

FIGURA 23 - RELAÇÃO CARBOIDRATO:PROTEÍNA NO EPS ISOLADO DO CO-CULTIVO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO



5.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS EPSs

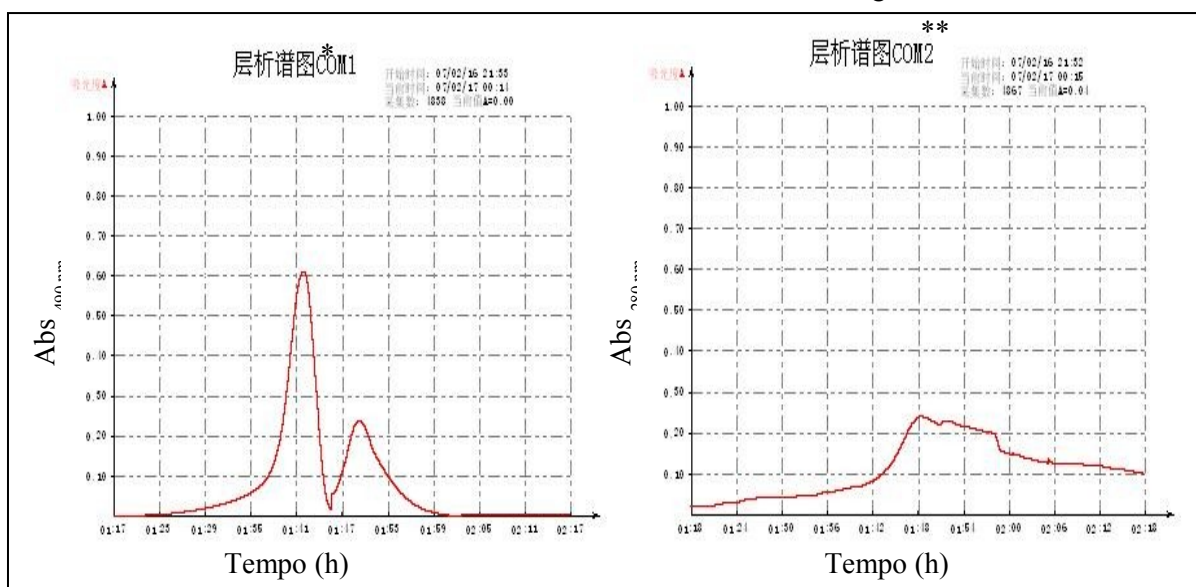
Com o objetivo de caracterizar parcialmente o EPS produzido em co-cultivo, os mesmos foram isolados, purificados e analisados qualitativa e quantitativamente por FPLC, RMN (deslocamentos químicos em (δ) ppm), métodos cromatográficos e composição monossacarídica.

Não há na revisão bibliográfica uma metodologia padrão para a caracterização de polissacarídeos de fungos ou bactérias, existindo, portanto diferentes métodos para obtenção e estudo de cada fração polissacarídica. O método de extração e separação, bem como a denominação dada às frações é peculiar de cada grupo de pesquisa nos diversos estudos de polissacarídeos produzidos por microrganismos. Entre as várias metodologias de obtenção de frações optamos pela separação em gel exclusão.

5.3.1 Caracterização Parcial do EPS Produzido por *A. brasiliensis*

A solução de EPS de *A. brasiliensis* (500 µg/mL) foi filtrada (0, 22 µm) e analisada em cromatógrafo FPLC acoplado a uma coluna de gel Superose®. A presença de carboidrato foi desenhada por difração de luz a 490 nm, revelando dois únicos picos; o detector de UV mostrou o perfil de proteínas presentes na amostra. A passagem de proteínas manteve-se constante (Figura 23). Esta cromatografia foi útil para verificar a presença de polissacarídeo e comparar o comportamento da amostra em Sepharose®. O material fracionado não pode ser trabalhado devido à pequena quantidade de material e o longo período para obtenção das frações.

FIGURA 23 – PERFIL CROMATOGRÁFICO EM FPLC DE EPS DE Ag

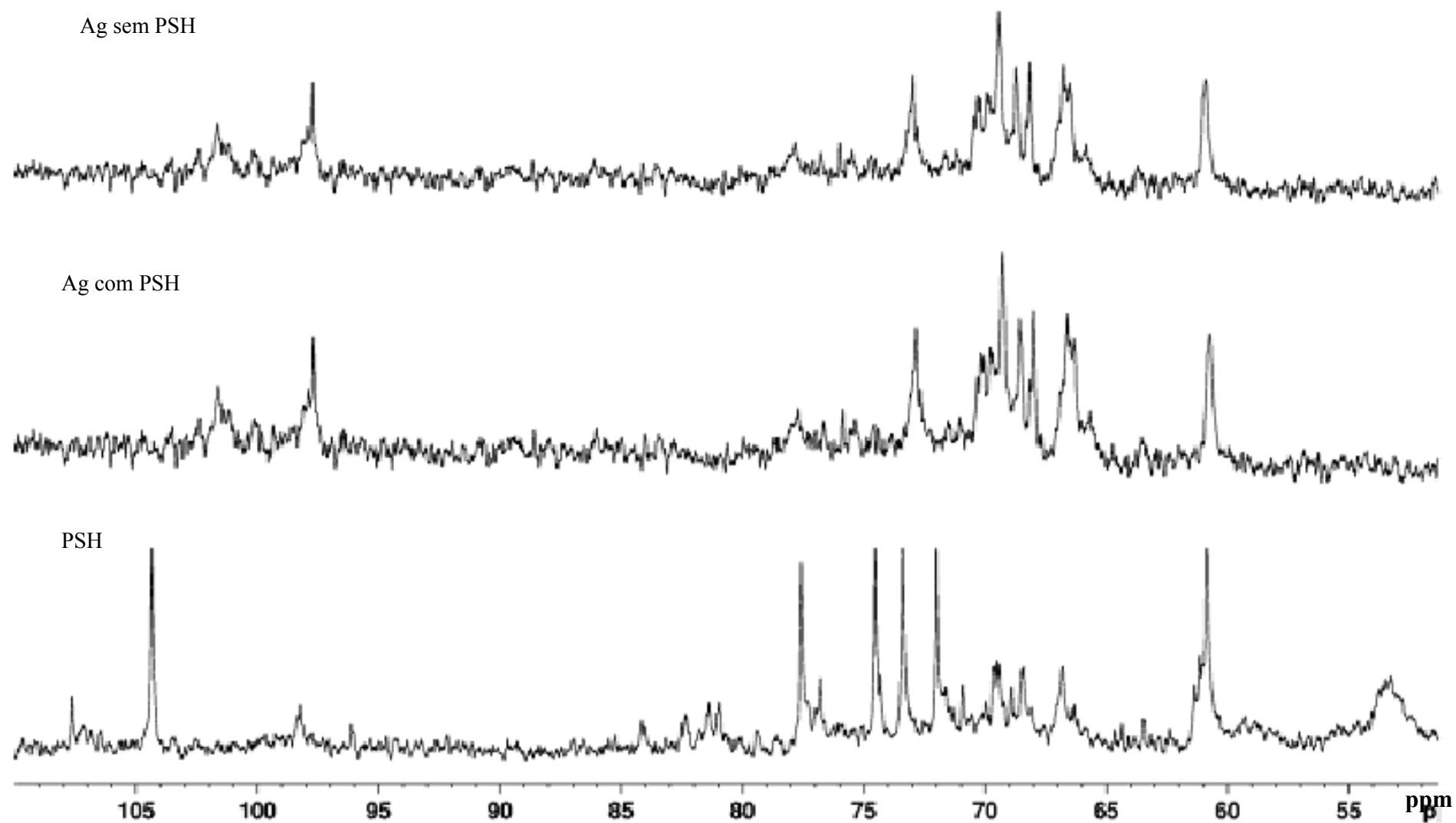


* COM1- perfil de carboidrato; ** COM2 – perfil de proteínas

A proteína de soja hidrolisada utilizada como substrato e o EPS bruto produzido pelo fungo em meio sem e com PSH foram analisados a fim de verificar se a presença da PSH poderia comprometer a estrutura do polissacarídeo. Para análise de ^{13}C RMN, 50 mg de cada amostra foi solubilizada em 400 µL de água deuterada (D_2O) e analisadas a 70°C. Os espectros revelam que não houve diferenças entre os EPSs Ag produzidos em meio sem e com PSH (Figura 25).

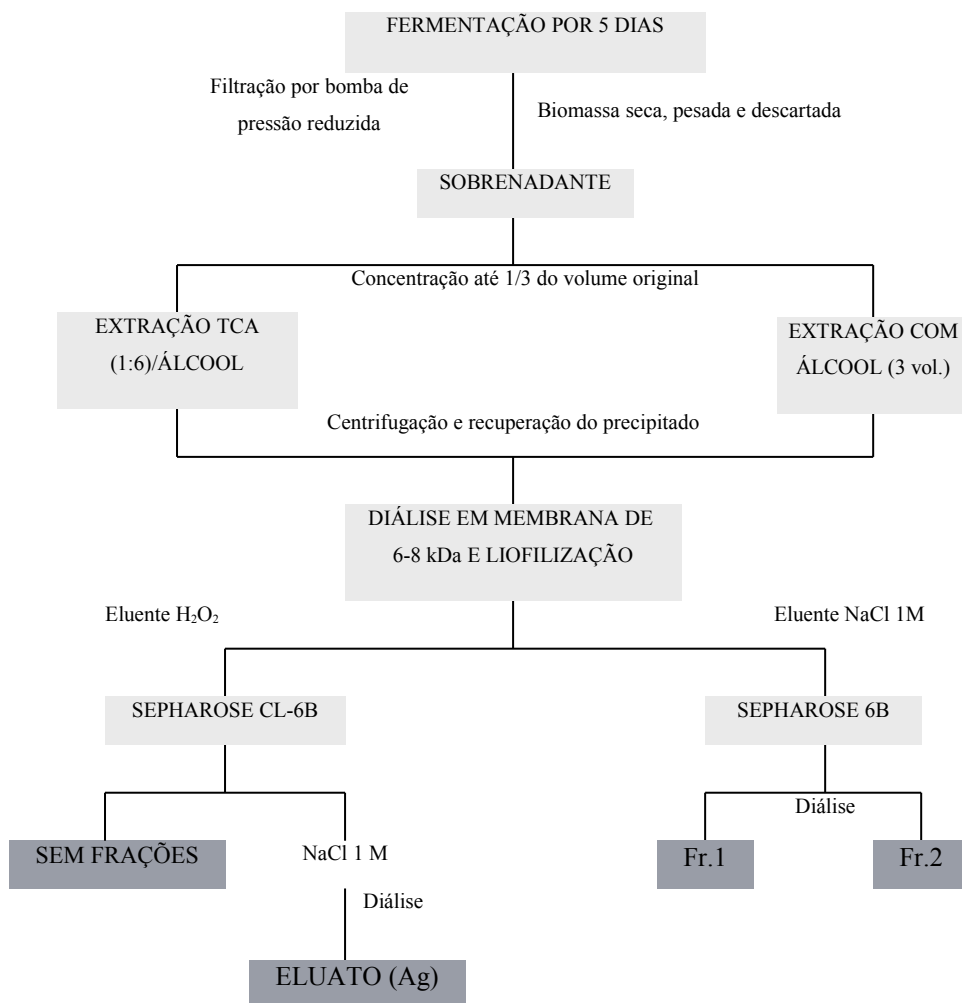
O espectro do EPS Ag revelou alta complexidade, reflexo da presença de diferentes padrões de substituição e sinais relativamente intensos na região anomérica

em δ 102,28 sugerindo configuração glicosídica do tipo β . Além desta, também pôde ser observados sinais mais intensos em δ 98,2 e δ 101,3 uma glicana apresentando unidades em configuração α e β . O espectro da PSH mostra uma estrutura menos complexa com sinais na região δ 107,76, 101,16 e 98,4.

FIGURA 25 – ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C RMN: EPS Ag BRUTO EXTRAÍDO DA FERMENTAÇÃO SEM E COM PSH E DO PSH

A Figura 26 mostra o fluxograma para obtenção das frações polissacarídicas do EPS produzido por *A. brasiliensis*.

FIGURA 26 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS DE *A. brasiliensis*



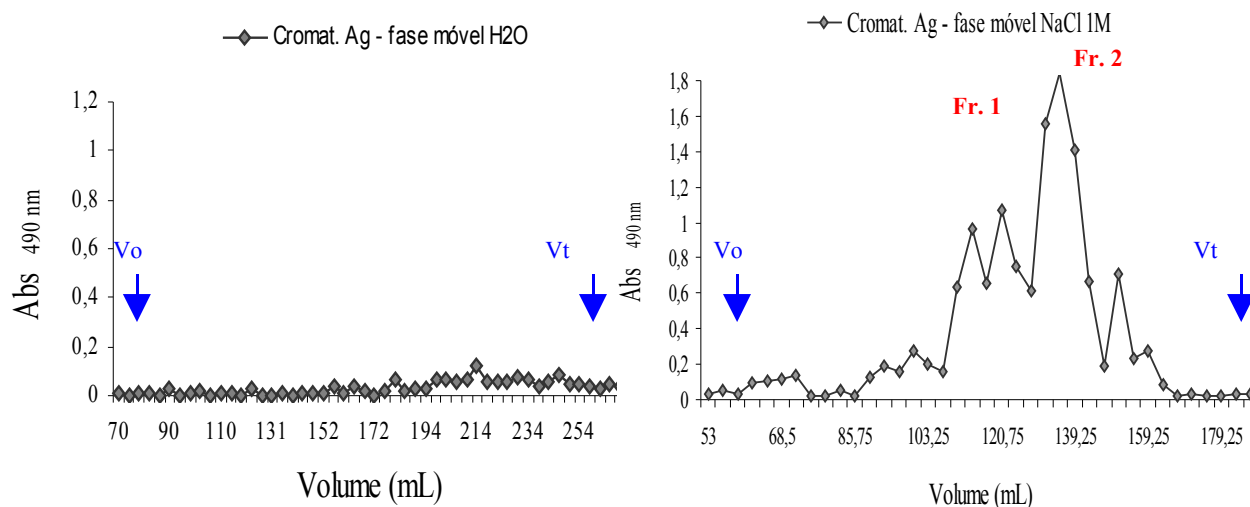
Na primeira etapa de purificação 150 mg da amostra foi solubilizada em 3 mL de água destilada e aplicada cuidadosamente na coluna de Sepharose CL-6B, cuja fase móvel foi água destilada. O rendimento foi de 5 %, o cromatograma mostrou-se descontínuo, sem separação de fração (Figura 27); o fluxo da coluna que era de 1,5 mL/min passara para 0,5 mL/min, pois a amostra ficara retida na coluna, fixando-se ao gel e obstruindo a passagem do fluxo. Ao utilizar NaCl 1M como fase móvel, pôde-se recuperar ~90% do material que estava retido na coluna; à amostra eluída denominou-se “ELUATO Ag”. Seguiu-se com o preparo da coluna 6B com eluente NaCl 1M. A

amostra aplicada e o fluxo manteve-se em 1,5 mL/min constante. Duas frações foram separadas. O rendimento foi de 64,9 %. As frações foram separadas, liofilizadas e o sal retirado por diálise “*overnight*”, cujos rendimentos foram: Fr.1 (48,3 %) e Fr.2 (16,6 %).

Não se sabe o motivo para a afinidade da amostra pela coluna quando a fase móvel utilizada foi água destilada, pois, tratando-se de uma coluna de exclusão a sepharose é neutra e não possui cargas negativas ou positivas. Não foi encontrada referências ou explicações plausíveis para o comportamento. No entanto, tal comportamento também foi observado nos EPSs isolados da bactéria, da PSH e do co-cultivo.

Peng *et al.* (2003) utilizou DEAE-Sepharose CL-6B equilibrada com água destilada e diferentes concentrações de NaCl em solução aquosa (0,04 e 0,1 M), 1,50 mL por tubo para carrear o polissacarídeo extracelular produzido pelo micélio de *G. tsungae*. Os autores obtiveram rendimentos de 0,63 mg para a fração EPF1 eluída com água destilada, 6,4 mg para a fração EPF2 eluída com 0,04 M e 1,26 mg da fração EPF3 eluída com 0,1M, respectivamente. A proteína-polissacarídeo absorvida na coluna foram retiradas por eluição com 2,0 M NaCl solução aquosa. Possivelmente a presença de proteínas ligadas ao EPS pode justificar a absorção da amostra pelo gel de exclusão, embora nas frações EPF1 e EPF2 não tenha sido detectada presença de proteínas.

FIGURA 27 – PERFIS DE ELUIÇÃO DO EPS Ag EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B

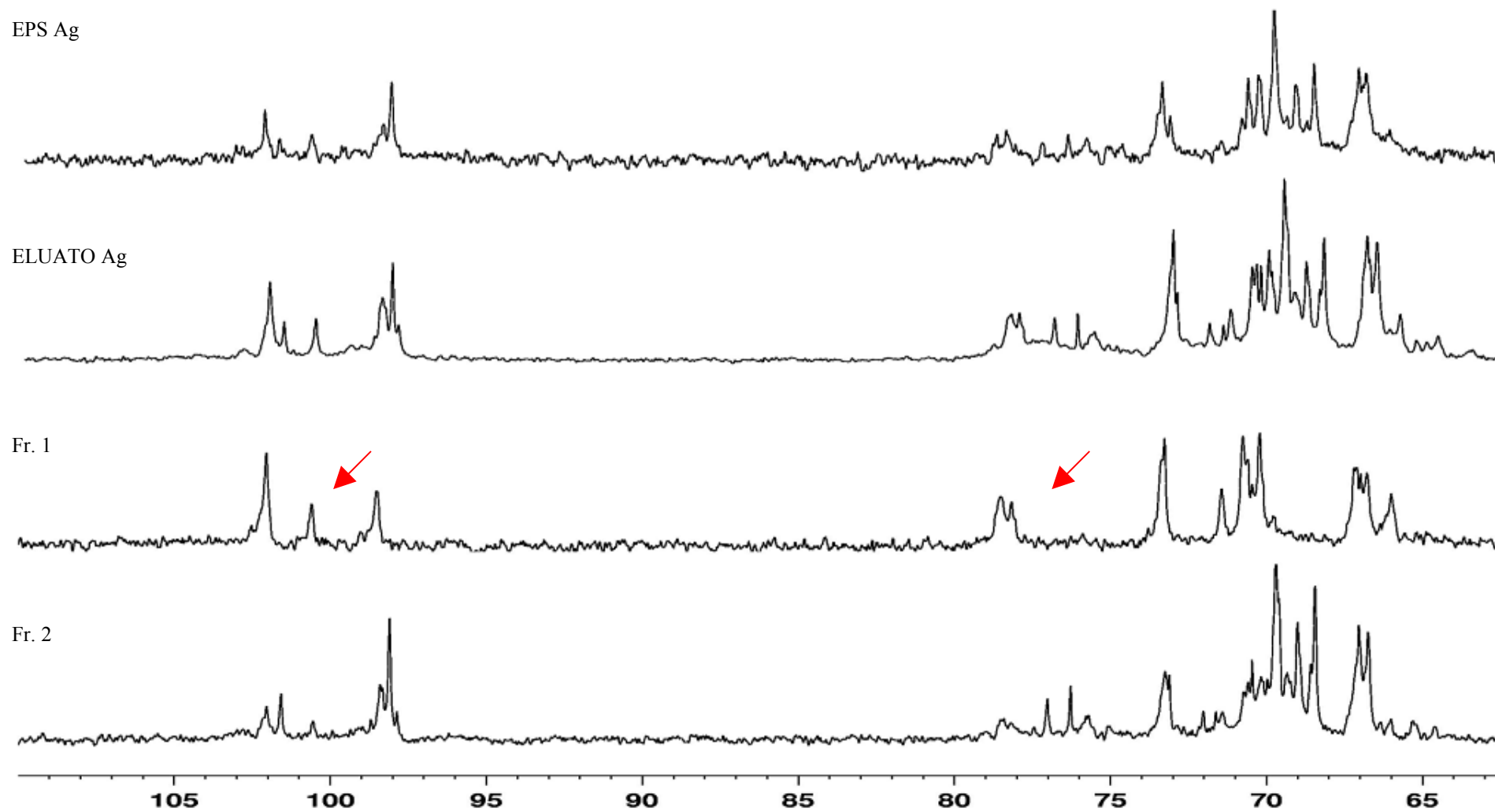


NOTA: H₂O e NaCl 1M como fases móveis, respectivamente

Os sinais apresentados nos espectros de RMN ¹³C (Figura 28), o EPS Ag trata-se do mesmo EPS encontrados na amostra do ELUATO Ag. Já os sinais presentes nos espectros das Fr.1 e Fr.2 diferem em algumas regiões. Para discutir seus sinais comparou-os a espectros encontrados por outros pesquisadores como: DONG *et al.* 2002; MIZUNO *et al.* 1990; OHNO *et al.*, 1985, 2001; SAITO *et al.*, 1976. Os sinais C-1 anoméricos aparecem cerca de δ 102,04 e 101,63 ppm, localizados perto da região δ 100,50, 98,40, 98,09 e 97,83 ppm atribuídos às configurações do tipo β . Os sinais para o C-6 substituído podem ser identificados em δ 72,84 e 71,42 e 70,27 ppm e para o C-6 não substituído sinal em δ 61,24 ppm, sugerindo uma maior presença de (1 \rightarrow 6)- β -glicana superior à presença de (1 \rightarrow 3)- β -glicana. Os sinais δ 78,56 e 78,18 ppm, são atribuído ao C-3 substituído, e apresentam-se mais fracos que o sinal C-3 não-substituído na região δ 73,27 ppm. Isto sugere que a maioria do C-3 não foi substituído, e uma pequena quantidade de (1 \rightarrow 3)-glicana estava presente.

Sabe-se que as β -glicanas e α -glicanas de *Agaricus brasiliensis* diferem de acordo com a fase de maturação ou sua origem: micélio, corpo de frutificação, intra ou exopolissacarídeo. Todos os espectros que apresentaram sinais 100,59 são α -configuração e ligações do tipo (1 \rightarrow 4)- α e (1 \rightarrow 6)- α e estão presentes onde há sinais δ 78,56 e 69,71 ppm, respectivamente.

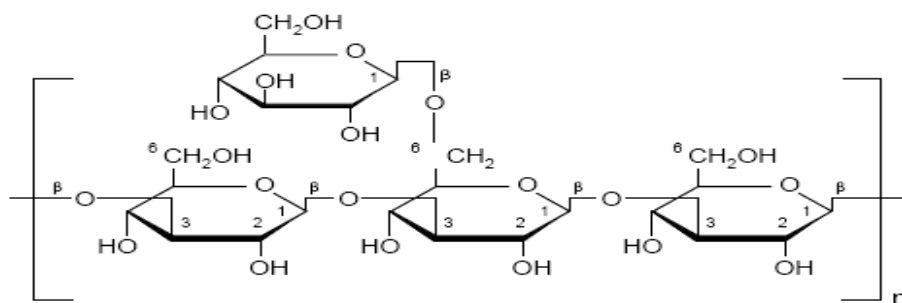
Segundo Dong *et al.* (2002) e Ohno *et al.* (2001), as glicanas extraídas de micélio de *A. blazei* são normalmente uma (1→6)-β e β-glicanas do corpo de frutificação possuíam uma estrutura (1→6)-β- com ligação (1→3)-β. Ohno *et al.* (1986) destaca que as glicanas lineares do tipo (1→6)-β- não possuem bioatividade. No entanto, as (1→3)-β-ligações são estruturalmente importante e reforçam a atividade imunomoduladora em polissacarídeos (Dong *et al.* 2002). Mizuno *et al.* (1990), evidenciaram que a atividade antitumoral está ligada a uma (1→6)-β-(1→3)-β-D-glicana solúvel em água. Além disso, a presença de EPS hidrossolúvel (1→4)-α-glicana no micélio do fungo também possui atividade biológica (Mizuno *et al.*, 1990). Logo, tanto o EPS do corpo de frutificação quanto do micélio de *A. brasiliensis* podem ser utilizados como produto nutracêutico, possibilitando ao consumidor uma maior diversidade de glicanas, seja como antitumoral ou como imunomodulador, antiviral, antioxidante, etc.

FIGURA 28 – ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C RMN: EPS Ag E FRAÇÕES

→ Sinais que diferem entre o espectro da Fr.1 e Fr.2

Glicanas que apresentam dois tipos de configuração, α e β , têm sido descritas em basidiomicetos, como o *Astreus hygrometricus*, o qual sintetiza um polímero contendo uma cadeia linear de α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) (CHAKRABORTY *et al.*, 2004). Em *Ganoderma lucidum* foi caracterizado um polímero contendo altos teores de glicose (Glc:Xyl:Ara em uma proporção molar de 18,8:1,5:1,0) com cadeia principal e laterais constituídas por unidades de Glcp contendo ligações α - e β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6). Porém, ainda não foram realizadas análises complementares para caracterização de sua estrutura fina, sendo que estudos adicionais tornam-se necessários para a elucidação da estrutura da molécula isolada. Como regra geral, as β -D-glicanas (Figura 29) têm maior atividade antitumoral que suas glicanas livres correspondentes; e α -D-Glucanas de cogumelos usualmente não possuem atividade antitumoral (LINDEQUIST *et al.*, 2005). Gonzaga *et al.* (2005), mostram que a configuração β -glicanas é predominante nos basidiomicetos que a configuração α -glicanas e que as proteínas encontram-se em pequenas quantidades.

FIGURA 29- DESENHO DE UMA β -D-GLUCANA



FONTE:YANAKI *et al.*, 1983

Nie *et al.* (2006) e Hsieh *et al.* (2006), afirmam que tanto o corpo de frutificação quanto o micélio de *G. frondosa* produzem polissacarídeos com atividade antitumoral. Estes polissacarídeos têm sido descritos como β -1,6 e β -1,3. Kodama *et al.* (2002) citado por Cui *et al.* (2005), afirmam que, especialmente a fração β -1,6 possui atividade imunoestimuladora e que, quando sulfatadas, as glicanas podem acelerar a atividade antitumoral, demonstrado por vários mecanismos: inibição das

células SGC-7901, indução de apoptose, crescimento e melhora na fagocitose dos macrófagos (NIE *et al.*, 2006).

A análise monossacarídica do EPS Ag bruto revelou a presença de uma galactomanana composta por 55,6 % de manose, 23% de galactose e 10,2 % de glicose. No entanto, o Eluato Ag apresentou composição majoritária de xilose (59,9 %) seguida de ramnose (11,0 %), manose e ribose (10,3 %), com pequenas quantidades de glicose e galactose, uma possível xilomanana. Wasser e Weis (1999) descreveram substâncias de origem macromicética com atividade antitumoral ainda não esclarecidas como vários polissacarídeos hetero-beta-glicanas e seus complexos-proteínas (ex. xiloglicanas e ácido beta-glicana-contendo ácido urônico).

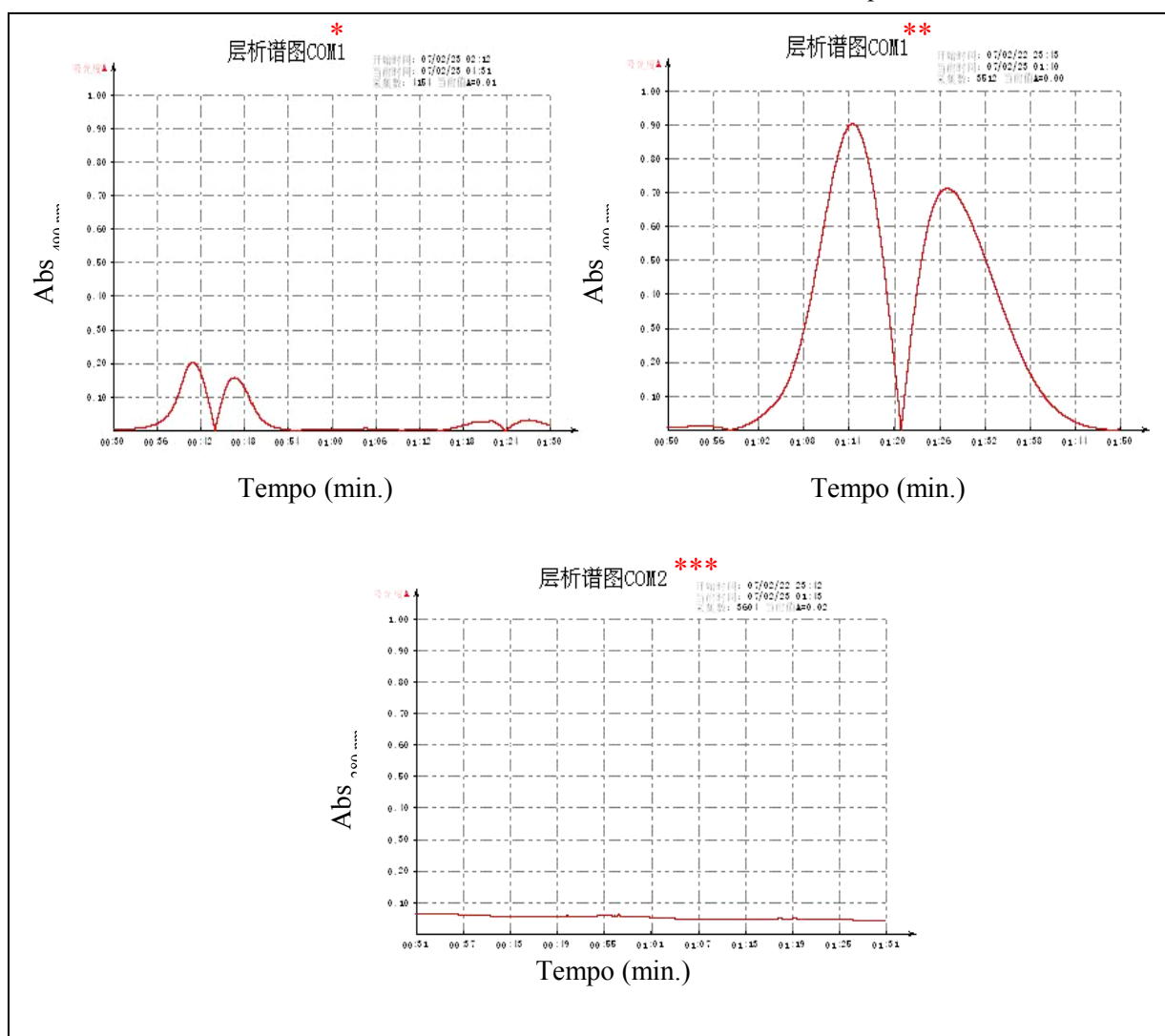
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS Ag E SUAS FRAÇÕES COMPARADA COM O PSH

Fração	Composição monossacarídica (mol %)*									%	
	Ram	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Total	Carb.	Prot.
Ag(bruto)	0,9	2,6	1,3	...	6,3	55,6	23,0	10,2	100	98 (± 2)	0,2 ($\pm 0,5$)
Eluato Ag	10,3	...	10,3	...	59,9	11,9	3,2	4,4	100	92,5($\pm 0,2$)	7 ($\pm 0,7$)
PSH	45,2	8,7	38,3	7,8	100	52 ($\pm 6,1$)	28 ($\pm 4,3$)

* Monossacarídeos quantificados em GC-MS em moles % na forma de acetatos de alditóis após hidrólise ácida total, redução e acetilação

5.3.2 Caracterização Parcial do EPS Produzido pelo *Lactobacillus paracasei*

O perfil cromatográfico para o EPS B7 em Superose[®], acoplada ao aparelho FPLC, também foi realizado. O software utilizado desenhou dois pequenos picos no início da cromatografia e dois picos maiores no final dela (Figura 30) por índice de refração. O detector de UV acoplado ao aparelho revelou o perfil de proteico da amostra. Esta observação preliminar foi útil apenas para observar a presença de carboidrato em Sephadex.

FIGURA 30 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM FPLC DO EPS DE *Lb paracasei*

COM1- perfil de carboidrato: * primeiros picos; ** últimos picos; *** COM2 - perfil de proteína

O EPS B7 bruto, produzido pela BAL em meio contendo PSH, assim como a PSH isolada foram analisadas por ^{13}C RMN para verificar a complexidade da estrutura do polissacarídeo (Figura 31). Após várias tentativas, não foi observada produção de EPS por *Lb paracasei* em meios mais simples, sem a presença da PSH.

Para análise ^{13}C RMN as amostras foram solubilizadas em água deuterada (D_2O) (50 mg/400 μL). A análise mostrou que o EPS extraído do cultivo da BAL e a PHS tratam-se da mesma estrutura, ambos espectros apresentaram sinais nas regiões δ 104,45, 77,59, 74,56, 72,14 e 60,86 demonstrando a presença de uma $\beta\text{-Galp}(1\rightarrow4)$.

induzindo-nos, a pensar que não haveria produção de biopolímero pela bactéria láctica ou que a PSH incorporara ao EPS do microrganismo.

A amostra do EPS B7 foi eluída primeiramente em água para cromatografia em Sepharose CL-6B e, posteriormente em NaCl 1M para cromatografia em Sepharose CL (Figura 32) a fim de verificar a presença de frações puras que pudessem evidenciar alguma diferença entre os EPSs B7 e PSH.

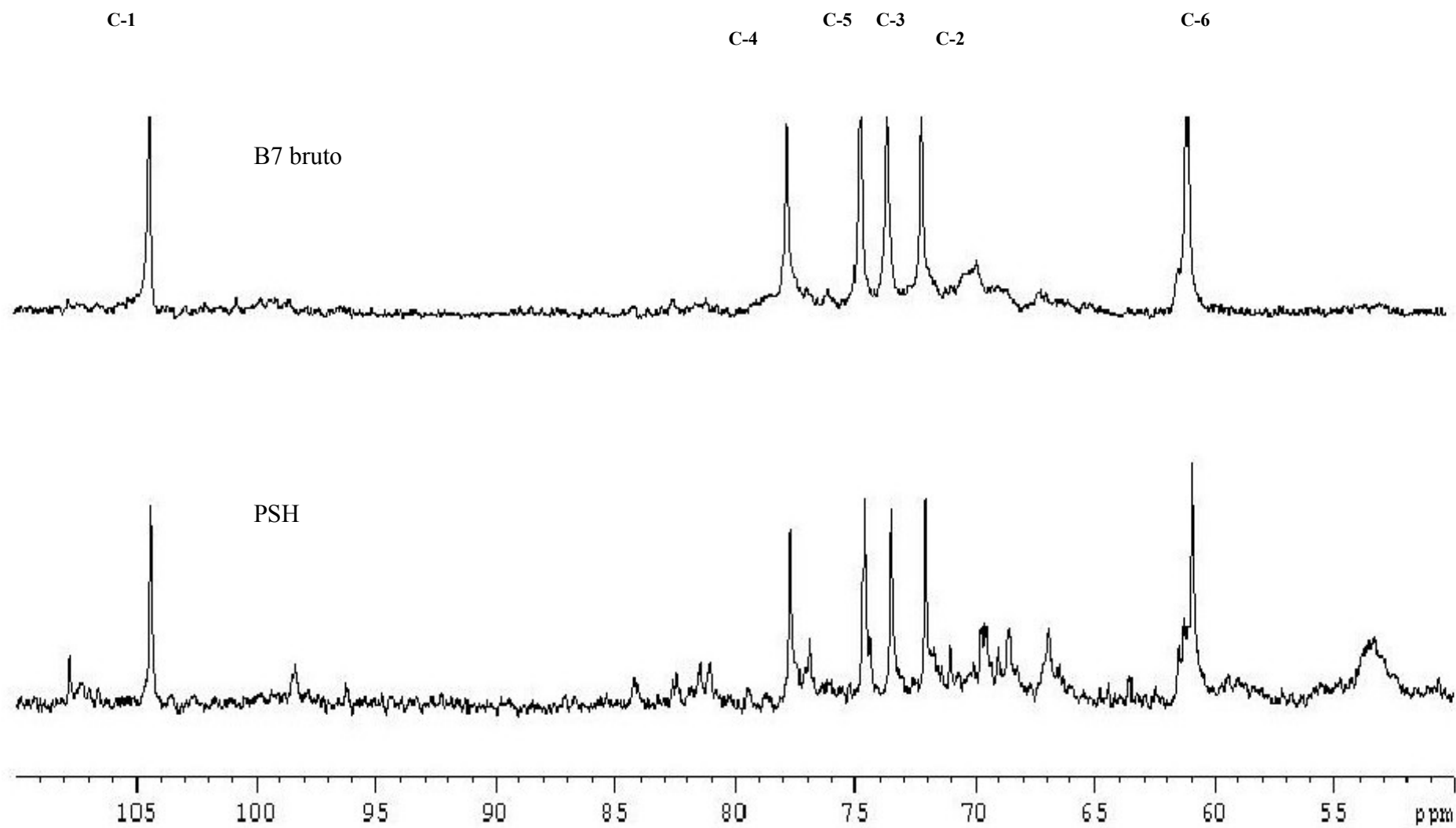
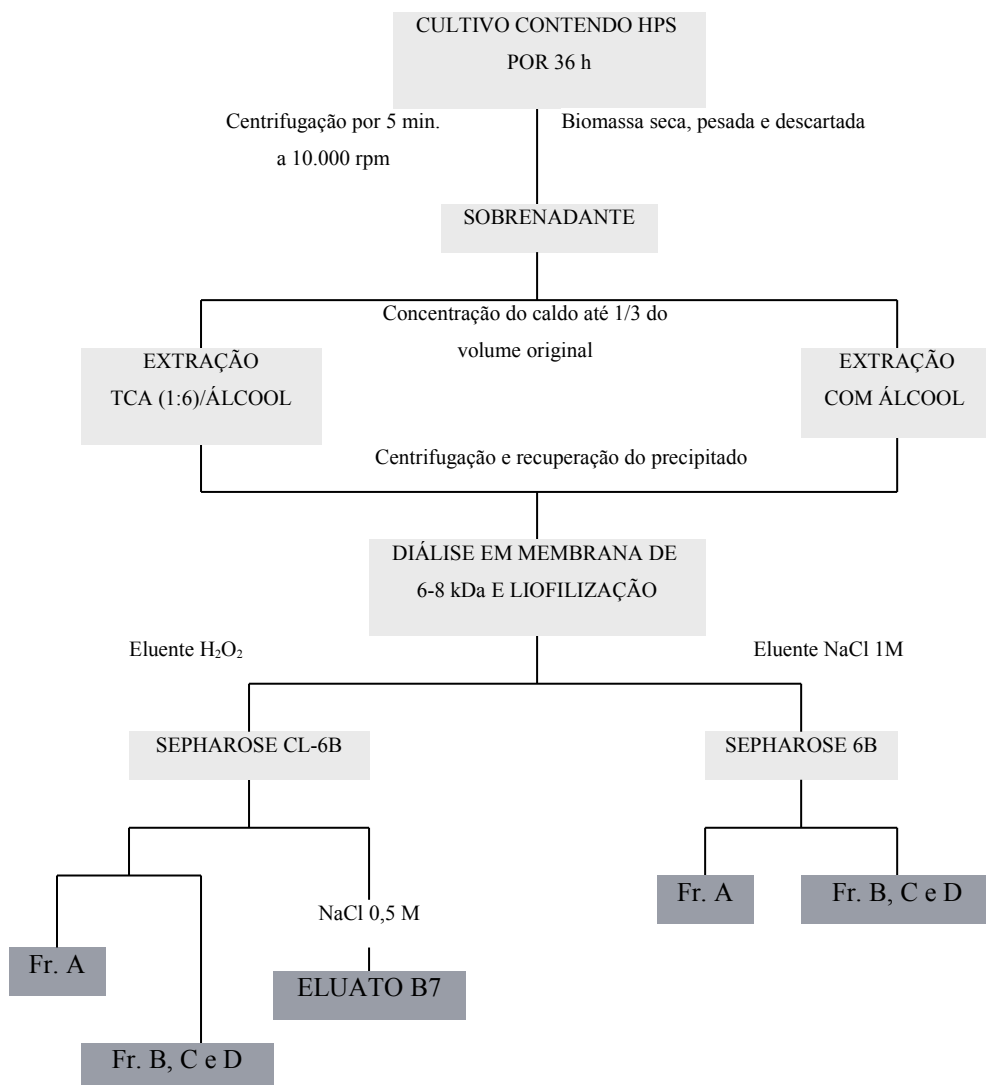
FIGURA 31 – ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C -RMN DE EXOPOLISSACARÍDEO B7 E PSH

FIGURA 32 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS DE *Lb. paracesei*

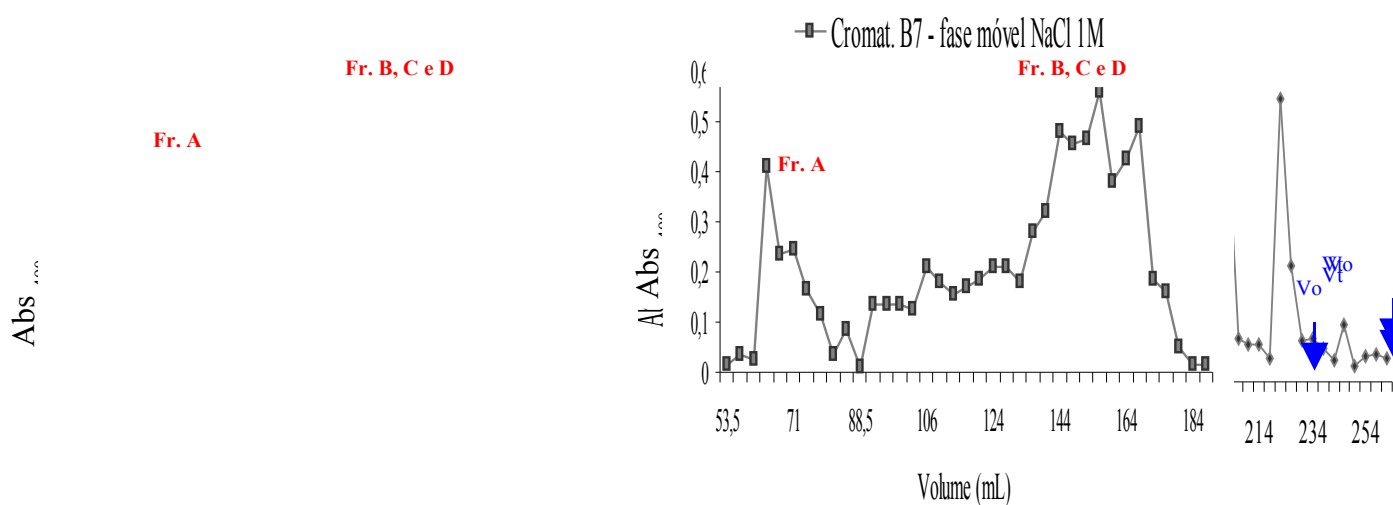
Para a cromatografia em Sepharose CL-6B, foi utilizada 150 mg de EPS B7 para 3 ml de água destilada. Foi possível separar 4 frações: Fr. A (4,5 mg), seguidas de 3 outras frações no final da cromatografia: Fr. B (6,75 mg), Fr. C (10,5 mg) e Fr. D (5,5 mg). O rendimento foi de 18,21 %. Porém, a maior parte da amostra ficou retida no gel (Figura 33). Ao final da cromatografia utilizou-se NaCl 1M para eluir a amostra retida, 74,4 % da amostra foi recuperada e denominada ELUATO B7. O fluxo da coluna durante o processo variou de 1 - 1,27 mL/min.

A Figura 34 mostra o aspecto da coluna durante absorção da amostra no gel (eluição com água) e após a eluição com sal.

Uma nova coluna foi montada usando NaCl 1M como fase móvel. A amostra desprende-se do gel, correndo normalmente e o rendimento foi de 98 %, o fluxo manteve-se em aproximadamente 1,2 mL/min. As frações Fr.A, fr.B, Fr.C e Fr.D foram separadas, ou seja, o perfil cromatográfico para ambas corridas foi o mesmo, o que diferiu foi o rendimento (Tabela 8).

Os picos iniciais e finais da cromatografia em Sepharose® concordam com o perfil de carboidratos apresentado pelo programa do FPLC em Sephadex®, mostrando reprodutibilidade e separação das frações.

FIGURA 33 – PERFIS DE ELUIÇÃO DO EPS B7 EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B



NOTA: Utilizando H₂O e NaCl 1M como fase móvel, respectivamente

FIGURA 34 – ASPECTO DA COLUNA DURANTE E APÓS ABSORÇÃO DO EPS B7 EM DIFERENTES FASES MÓVEIS



1-Amostra absorvida no gel (eluição com água)

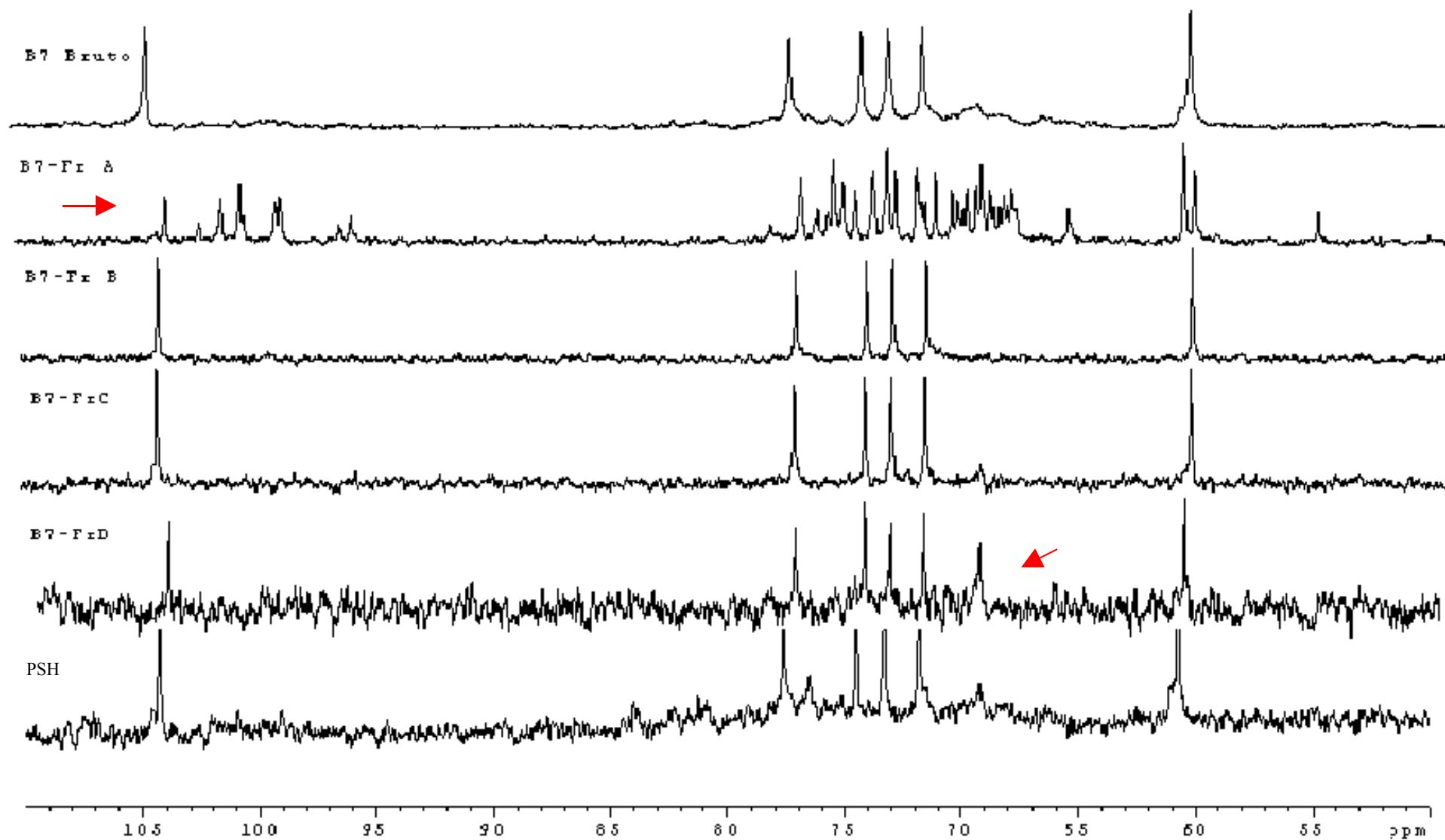
2-amostra correndo no gel (eluição com sal)

TABELA 8 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DO EPS B7 EM DIFERENTES FASES MÓVEIS

FASE MÓVEL FRAÇÕES	ÁGUA DESTILADA	NaCl 1M (SAL)
	%	
Fr.A	3	9,75
Fr.B	6,75	36,6
Fr.C	7	18,3
Fr.D	3,71	26,6
Eluato B7	74,4	...

Sabe-se que a cromatografia em gel efetua a separação conforme o tamanho efetivo das moléculas e que as moléculas grandes apresentam uma maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, emergindo mais rapidamente. De acordo com os perfis cromatográficos acima, pode-se afirmar que a Fr. A corresponde a média de aproximadamente $6,7 \pm 3,4$ % do total de EPS, possui maior peso molecular que as demais frações (Fr. B, C e D). Estas possuem velocidade de deslocamento menor, característica de moléculas pequenas, já que precisam passar através do gel ou suporte.

O que se pode observar no espectro ^{13}C de RMN (Figura 35) é que a Fr. A é completamente diferente do EPS Bruto e das demais subfrações. Talvez, devido à pequena quantidade desta fração presente na amostra total (3%), ela pode ter sido

FIGURA 35 – ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C RMN DO EPS B7 E FRAÇÕES

→ Sinais que diferem dos demais espectros

É possível a fração Fr. A tratar-se do EPS produzido pelo *Lb paracasei* e que os demais carboidratos (EPS bruto, o Eluato B7, a PSH) provenha da soja utilizada como fonte de nitrogênio no meio de cultivo, pois, apresentam os mesmos sinais exceto pela presença de um sinal mais intenso na região δ 69,62 na Fr. D (Figura 35). A presença deste sinal mais intenso na região δ 69,62 no espectro da Fr. D pode ser explicado por uma mudança de ligação ocorrida devido à fermentação da PSH pela bactéria láctica. Para ter mais segurança na afirmação destas hipóteses, a PSH usada no cultivo foi estudada separadamente (item 5.3.3) sob as mesmas condições trabalhadas.

A análise monossacarídica do EPS B7 bruto revelou a presença de uma β -Galp(1 \rightarrow 4) composta por 51,8 % de manose, 24,3 % de galactose e 11,8 % de glicose (Tabela 9), revelando uma galctomanana. Considerando que a Fr.A é de origem bacteriana e cuja composição majoritária é glicose (50,9 %), raminose (33,9 %) e galactose (14,1 %), pode-se dizer que o resultado obtido concorda com os estudos realizados por De Vuyst em 1999, cuja composição monossacarídica de um EPS isolado do fermentado de bactéria ácido-láctica correspondeu a: glicose (50,9 %) seguida de ramnose (33,9 %) e galactose (14,15 %) com peso molecular acima de 200 kDa (Tabela 9).

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EPS B7

Fração	Composição monossacarídica (mol %)*								%	
	Ram	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Carboidrato	Proteína
B7 (bruto)	32,3	22,6	9,1	23,3	12,7	70 (\pm 16)	12,4(\pm 4,5)
Fr. A	33,9	0,6	0,5	14,1	50,9	92 (\pm 0,5)	2 (\pm 0,1)
Eluato B7	5,7	21,9	23,1	...	47,8	1,5	65 (\pm 6,7)	13(\pm 2,1)
PSH	45,2	8,7	...	38,3	7,8	55 (\pm 6,1)	28(\pm 4,3)

* Monossacarídeos quantificados em GC-MS em moles % na forma de acetatos de alditóis após hidrólise ácida total, redução e acetilação

A maioria dos heteropolissacarídeos das BALs são produzidos por bactérias mesófilas (por exemplo, *Lactococcus lactis*, *Lb sakei*, *Lb rhamnosus*, *Lb casei*) ou termofílicas (por exemplo, *Lb Acidophilus*, *Lb delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lb helveticus*, e *Streptococcus thermophilus*). De Vuyst (2003) citado por Vaningelgen *et al.* (2004b) tentou classificar os EPSs das BALs mesofílicas de acordo com as suas

composições monoméricas; três grandes grupos foram distinguidos: (i) EPS contendo apenas galactose, (ii) EPS contendo galactose e glicose, e (iii) EPS contendo galactose, glicose e ramnose, cujas massas moleculares variam entre 10 KDa (van Geel-Schutten *et al.*, 1998 citado por Vaningelgen *et al.*, 2004b) a valores acima de 200 kDa (Almirón-roig *et al.*, 2000 citado por Vaningelgen *et al.*, 2004b), podendo chegar até a 1000 kDa (De Vuyst e Degeest, 1999; De vuyst, 2000; Lemoine, 1997; Navarini *et al.*, 2001 citados por Vaningelgen *et al.*, 2004b).

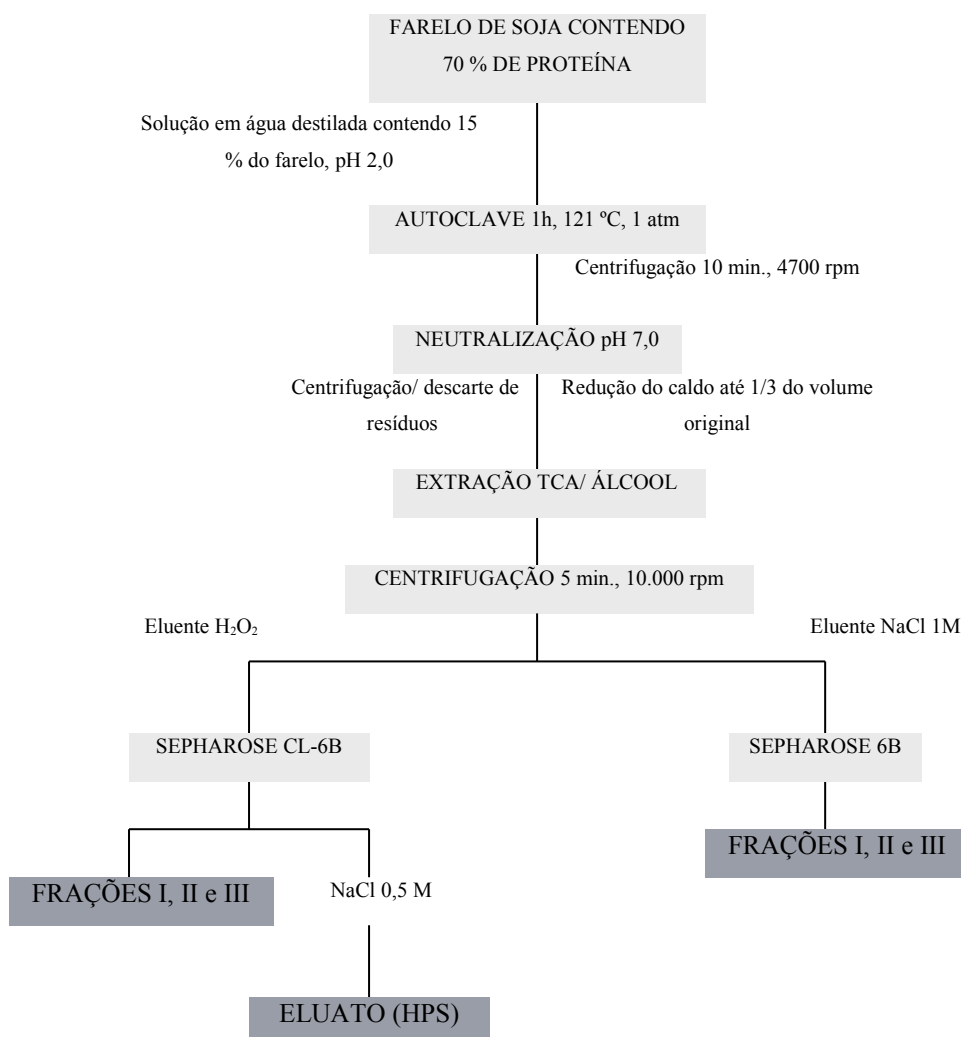
5.3.3 Caracterização Parcial da Proteína de Soja Hidrolisada (PSH)

O objetivo de hidrolizar o farelo da proteína de soja foi degradar todos os açúcares complexos, ou complexos protéicos e transformá-los em peptídeos e aminoácidos livre e de fácil assimilação, a fim de serem utilizados no metabolismo dos microrganismos. No entanto, a hidrólise em pH 2, durante 1h não foi suficiente para a degradação do EPS descoberto após caracterização dos EPSs isolados. Logo, o EPS resistente à hidrólise foi parcialmente purificado utilizando os mesmos métodos para os demais EPSs.

O EPS da PSH foi solubilizado em D₂O (50mg/400 µL) para análise de ¹³C-RMN, cromatografia em gel exclusão, composição monossacarídica da amostra e análise das frações. Na cromatografia por gel exclusão, utilizou-se Sepharose CL-6B e Sepharose 6B, cujos eluentes foram água e NaCl 1M, respectivamente. As frações obtidas foram analisadas e comparadas com as frações do EPS B7 bruto.

A figura 35 mostra o fluxograma para obtenção das frações polissacarídicas da PSH.

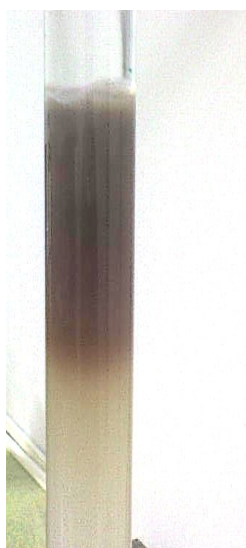
FIGURA 36 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA



O perfil cromatográfico para o EPS da PSH foi similar ao do EPS B7 bruto, com exceção da ausência da Fr.A. As três demais frações foram visualizadas no cromatograma. Para ter certeza do que se trata cada uma delas, espectros de RMN de cada fração foi analisada e comparadas entre si. Para cromatografia, aproximadamente 150 mg da PSH foi solubilizada em água destilada e adicionada à coluna. O comportamento da amostra em água destilada como fase móvel foi o mesmo dos demais polissacarídeos. O rendimento foi de 48,8 %. As frações obtidas foram: Fr. I (17,5 mg), Fr.II (17,4 mg), Fr. III (6,75 mg) e o ELUATO HPS (21,6 mg) recuperado após eluição com NaCl 1M. O fluxo foi de 1,25 a 0,97 mL/min. A Figura 37 mostra o aspecto da coluna antes e após eluição com NaCl.

FIGURA 37 – ASPECTO DA COLUNA EM DIFERENTES FASES MÓVEIS

1



2



1-Amostra absorvida no gel em eluição com água

2-amostra correndo no gel, eluída com sal (NaCl 1M)

Para cromatografia em Sepharose 6B, utilizou-se NaCl 1M como fase móvel e 60 mg da amostra foram aplicadas. O rendimento foi de 77 % e o fluxo manteve-se em aproximadamente 1,2 mL/min. Três frações puderam ser separadas: Fr.I (10,5 mg), Fr.II (10 mg) e Fr.III (23,94 mg). Não houve retenção da mostra pela coluna. O perfil cromatográfico para as diferentes fases (água destilada e NaCl) foi o mesmo (Figura 38). A diferença entre as cromatografias foi apenas o rendimento:

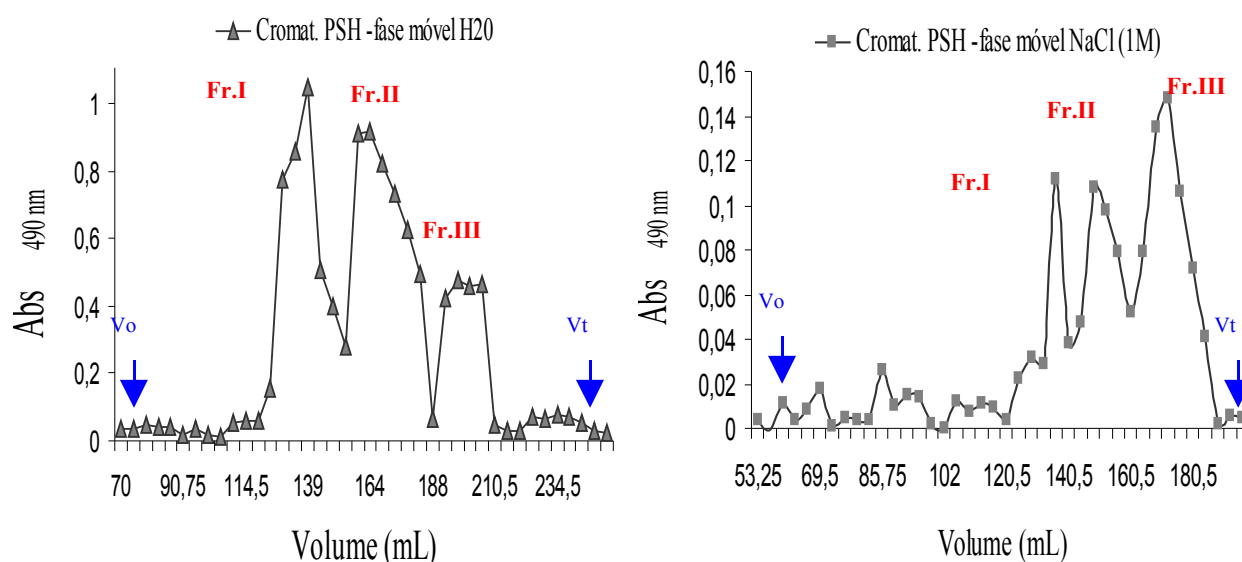
TABELA 10 – RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DA PSH EM DIFERENTES FASES MÓVEIS

FASE MÓVEL	ÁGUA DESTILADA	NaCl 1M (SAL)
------------	----------------	---------------

FRAÇÕES	%	
Fr.1	11,7	17,9
Fr.2	11,6	15,5
Fr.3	4,5	39,5
Eluato HPS	14,5	...

É importante ressaltar que a Fr. A encontrada no perfil cromatográfico do EPS extraído da bactéria láctica, não foi observada em nenhuma das cromatografias feitas com o EPS extraído da PSH. Neste caso, pode-se concluir que a Fr. A realmente provém do *Lb. paracasei* e que a maior parte do EPS total extraído do fermentado é polímero da proteína de soja que precipitou junto com o EPS bacteriano no momento da extração.

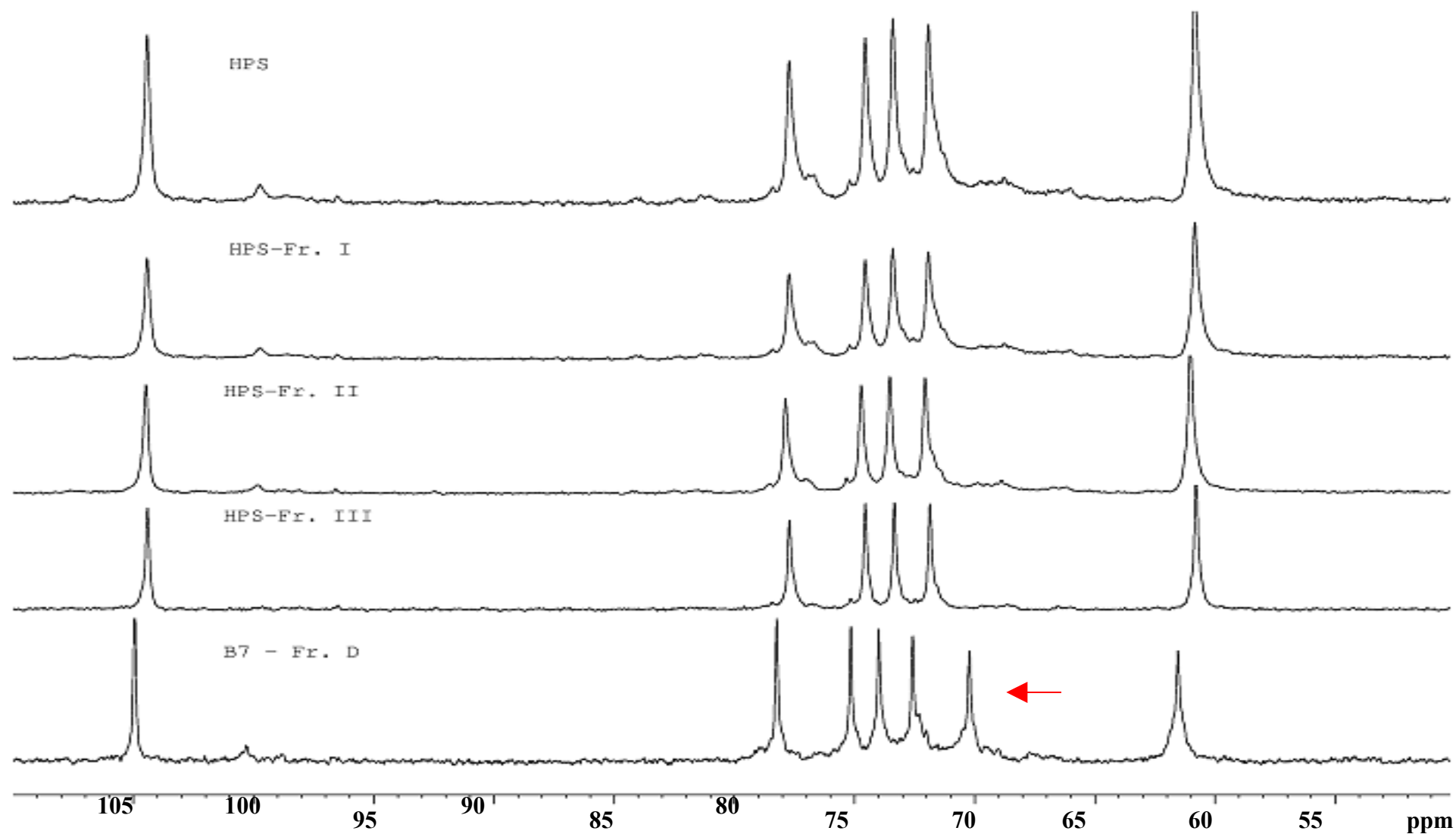
FIGURA 38 – PERFIS DE ELUIÇÃO DO EPS DA PROTEÍNA DE SOJA HIDROLISADA EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B



NOTA: utilizando H₂O e NaCl 1M como fases móveis, respectivamente

Análise ¹³C de RMN revelou uma β-(1→4)Galp. O espectro revelou que o EPS da PSH e suas frações são iguais, pois, apresentam os mesmos sinais que o espectro ¹³C do EPS B7 (Figuras 31 e 39). Os sinais representam carbono na região anomérica δ 104,55 (C-1) e δ 72,13 (C-2), 73,45 (C-3), 77,70 (C-4), 64,75 (C-5) e δ 61,00 (C-6). Nenhuma das três frações obtidas da PSH apresentou sinal intenso na região δ 69,78, este sinal foi encontrado apenas na Fr.D do EPS B7. Esta substituição pode ter origem na fermentação do EPS da PSH pelo *Lb paracasei* mudando a estrutura do polissacarídeo, o que pode conferir um aumento da atividade biológica deste EPS ou

inativação do mesmo. Faz-se necessário trabalhar com esta fração (Fr.D) mais detalhadamente a fim de avaliar o potencial biológico da mesma.

FIGURA 39 – ESPECTRO COMPARATIVO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES DA PSH E B7

→ Sinais que diferem entre os espectros HPS e a Fração D do EPS B7

A soja e derivados estão entre os alimentos mais consumidos em todo o mundo. Segundo Bertolini *et al.* (2006), proteínas e polissacarídeos são os principais componentes de soja. Sua farinha desengordurada tem grande utilização na indústria alimentar. A partir desta farinha, por extração aquosa, obtém-se uma arabinogalactana Tipo I (AG) contendo 6 % de ácido galacturônico. ^{13}C RMN e análises de metilação da AG revelou uma estrutura complexa, com uma cadeia principal $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-Galp}$ ligada, principalmente a cadeias laterais tendo O-5, O-3,5 e O-2,5 com unidades substituídas de $\alpha\text{-Araf}$, e 4-O- Glc . Devido à presença de 20 % de proteína os autores sugeriram que AG pode pertencer à classe de moléculas arabinogalactana-proteína. A extração aquosa do resíduo é feito por extração aquosa 2 % KOH (2 h, x 3, a 100 °C) e o extrato é tratado com ácido acético pH 5,0. A fração solúvel foi submetida a processo de congelamento-descongelamento, o que resultou em um precipitado (SAcP). Análise GC-MS de derivados alditól-acetato mostrou Rha, Fuc, Ara, Xyl, Gal e ácidos urônico em uma razão molar de 3:3:25:5:36:28. Diferente da AG, outro isolado arabinogalactana anteriormente caracterizado (SAcP) continha apenas 6,5 % de proteína e um maior teor de ácido urônico. Assim, os autores acreditam que a AG e SAcP pode ser uma arabinogalactanas diferente. O estudo destes polissacarídeos é de grande interesse, pois, são fontes de ativação do sistema imunológico. Tais dados são semelhantes aos resultados das análises realizadas com a PSH. A tabela 11 mostra que o EPS extraído da PSH é composto principalmente Ara, Gal, Xil e Glc, cuja proporção é de 45,2:38,3:8,7:7,8, e a quantidade de proteína presente no conjugado é de $28\pm4,3$ %.

A Tabela 11 mostra a composição monossacarídica do EPS B7, da PSH e suas frações. As diferenças quantitativas são evidentes quanto à composição das amostras: em ambos EPSs, a Ara a Gal são os componentes monossacarídicos majoritários, porém, a Xil compõe 8,7 % da PSH e 22,6 % da B7. Trata-se de uma diferença significativa, visto que a presença da xilose compõe 8,7 % da PSH e 22,6 % da B7, no entanto, na Fr. A este valor é de 0,6 %. A ausência de manose na PSH e sua presença no EPS B7 também podem ser consideradas, além da diferença na concentração de carboidrato:proteína: B7 possui menos proteína conjugada ao carboidrato que a PSH

(Tabela 11), que pode ser resultado da degradação das proteínas pelas BALs, transformando-as em peptídeos e/ou aminoácidos livres.

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS PSH E FRAÇÕES

Fração	Composição monossacarídica (mol %)*								%	
	Ram	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Carb	Prot
PSH(bruto)	45,2	8,7	...	38,3	7,8	55 ($\pm 6,1$)	28 ($\pm 4,3$)
Fr. 1	33,9	0,6	0,5	14,1	50,9	92 ($\pm 12,3$)	2 ($\pm 0,7$)
B7 (bruto)	32,3	22,6	9,1	23,3	12,7	70 (± 16)	8,4 ($\pm 4,5$)
Eluato B7	5,7	21,9	23,1	...	47,8	1,5	65 ($\pm 6,7$)	13 ($\pm 2,1$)

* Monossacarídeos quantificados em GC-MS em moles % na forma de acetatos de alditóis após hidrólise ácida total, redução e acetilação

As arabinanas, arabinogalactanas ou arabinoxilanas são estruturas de baixo peso molecular aproximadamente 36 kDa e facilmente degradadas pelas endo-galactanases, algumas vezes presentes no meio de cultivos ou produzidas por microrganismos e encontradas abundantemente em paredes celulares de plantas, como beterraba (sacarina arabinana, L-arabinose ligados a forma α -1,5-L-arabinana, onde unidades L-arabinofuranose estão ligadas, principalmente, na posição 3 α -configuração como cadeias laterais), cebola, batata e soja (na qual as arabinogalactanas têm uma cadeia linear de β -1,4-D-galactana com cadeias laterais α -1,5-L-arabinofuranooligossacarídeos) e de alguns microrganismos como *Bifidobacterium adolescentis* (β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-galactosidase), *Bacillus subtilis* e *Penicillium chrysogenum* (SAKAMOTO e THIBAUT, 2001; HINZ *et al.*, 2005).

Além do efeito imunomodulador das arabinogalactanas, estudos experimentais revelaram que as isoflavonas da soja possuem efeito quimioprotetor sobre vários tipos de câncer humano (YUAN *et al.*, 2003). As isoflavonas identificadas na soja são, principalmente, glicosídeos, incluindo genistina, daidzina e glicitina, conjugadas com glicose. Cita-se também a da função de inativação de DNA topoisomerase II, anti-angiogênese e inibição do crescimento celular por interferir no sinal de cascatas da proliferação celular. A genisteína existe como um glicuronídeo conjugado em órgãos e tecidos normais. Tecidos tumorais contêm grandes quantidades de β -glicuronidase, a

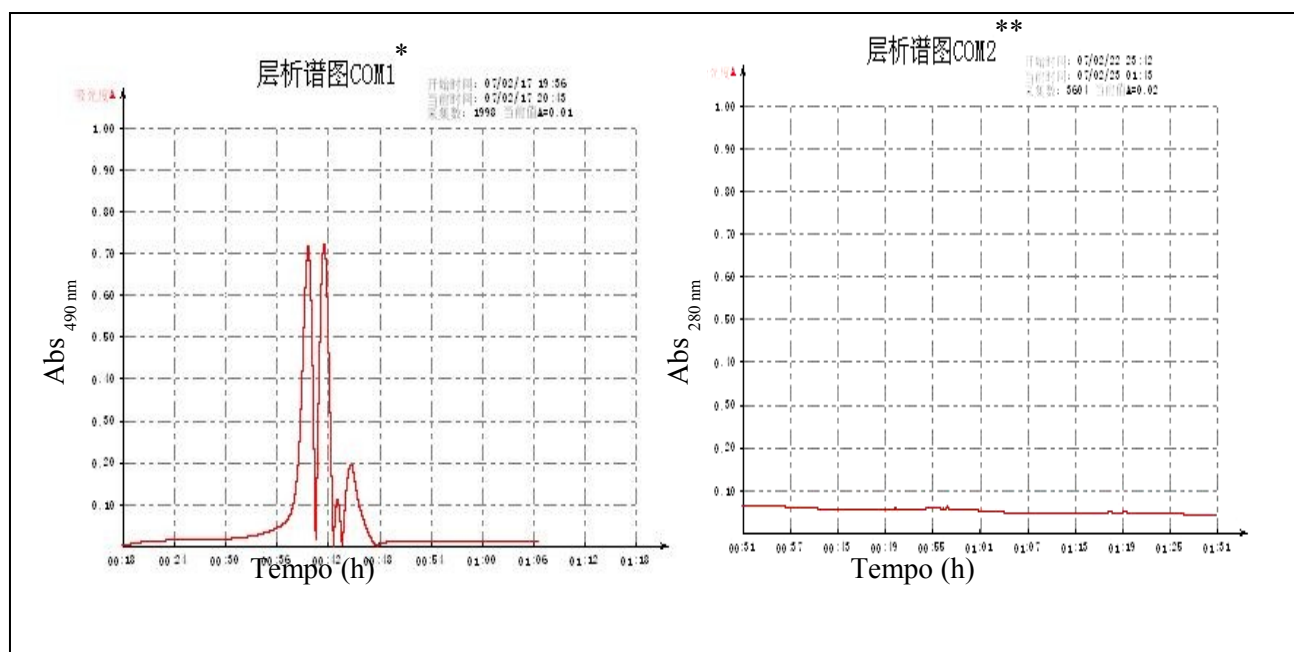
enzima que converte o genisteína-glicuronídeo conjugada em genisteína “aglicona”. É a resultante genisteína aglicona que exerce atividade quimioprotetora, incluindo a indução da apoptose em tecidos tumorais e indução da expressão da proteína p21 em tecidos tumorais, por último, levando a inibição do tumoral.

O GCP™ (Genistein Combined Polysaccharide) é um alimento funcional composto por $116 \pm 8,4$ mg de genisteína, $28,5 \pm 5,4$ mg de daidzeína, $13,5 \pm 2,6$ mg de gliciteína e ~ 3 % de polissacarídeo insolúvel de basidiomiceto (MIURA *et al.*, 2001 citado por YUAN *et al.*, 2003), obtido a partir dos extratos de soja fermentados com EPS produzido por micélios de basidiomicetos. Esta mistura está em alta no Japão e na China. O GCP™ contém alta concentração de isoflavona agliconadas e alto teor de polissacarídeos. No intuito de revelar os mecanismos de GCP™, YUAN *et al.*, (2003), investigou os efeitos do crescimento do tumor MDA-MB-231 (células do câncer de mama humano) transplantado em camundongos e ratos sob administração oral da mistura por 28 dias. O tratamento inibiu significativamente o crescimento tumoral.

5.3.4 Caracterização Parcial do EPS Produzido em Co-cultivo (Ag+B7)

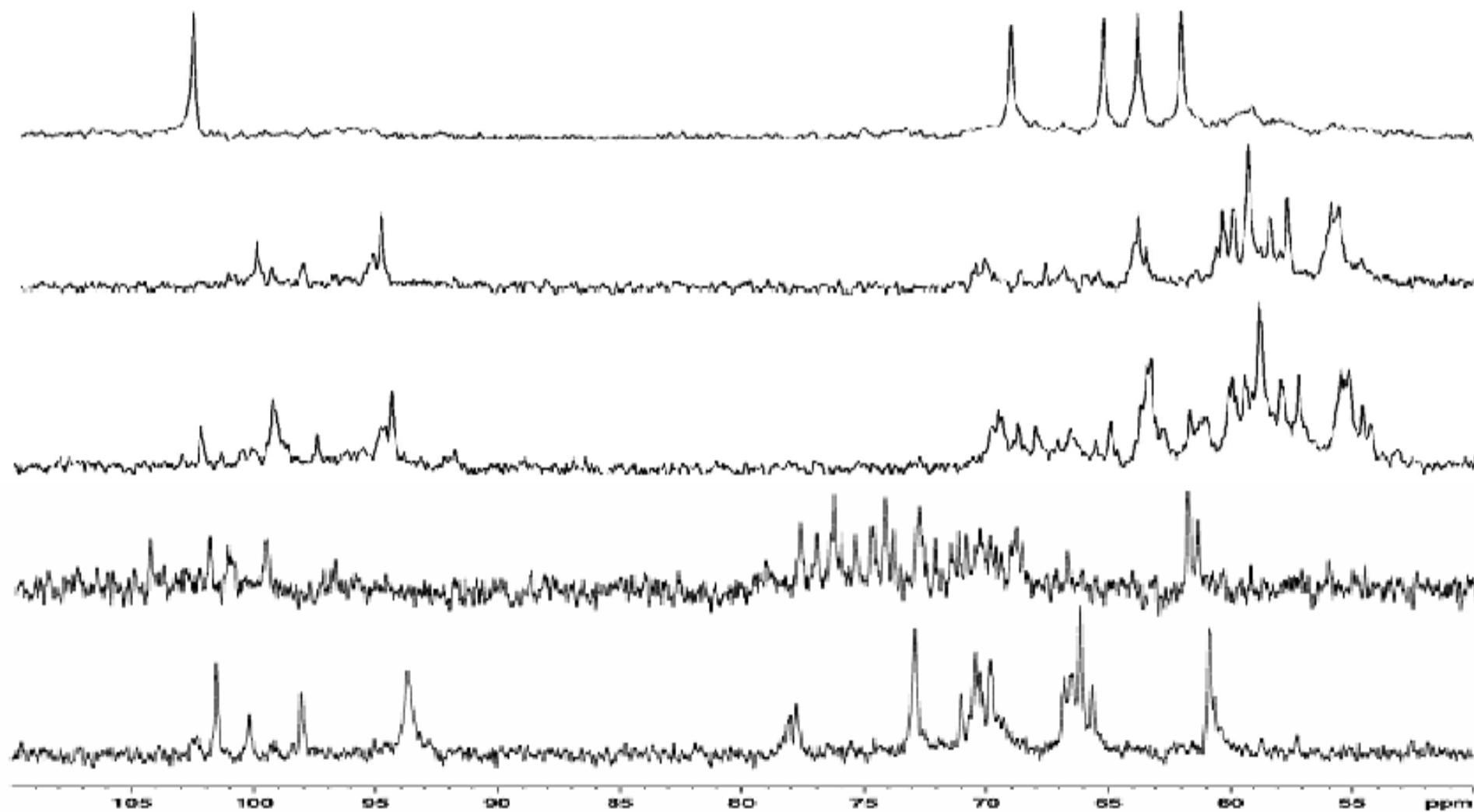
Como objetivo maior deste trabalho foi caracterizar parcialmente e analisar o potencial biológico do EPS produzido em co-cultivo entre *A. brasiliensis* e *Lb. paracasei*, após estudar as estruturas dos EPSs produzidos em cultivos isolados dos microrganismos, partiu-se para o estudo do EPS denominado Ag+B7. Para visualizar o perfil cromatográfico da amostra, 2 mL de um filtrado (0,22 μ m) contendo 1 mg de EPS solúvel em água mili-Q foi aplicado no aparelho FPLC a uma coluna Superose®. O perfil para carboidratos a 490 nm revelou a presença de três picos na amostra; o detector de UV 280 nm mostrou o perfil de proteínas presentes (Figura 40).

FIGURA 40 – PERFIL CROMATOGRÁFICO EM FPLC DE EPS Ag+B7



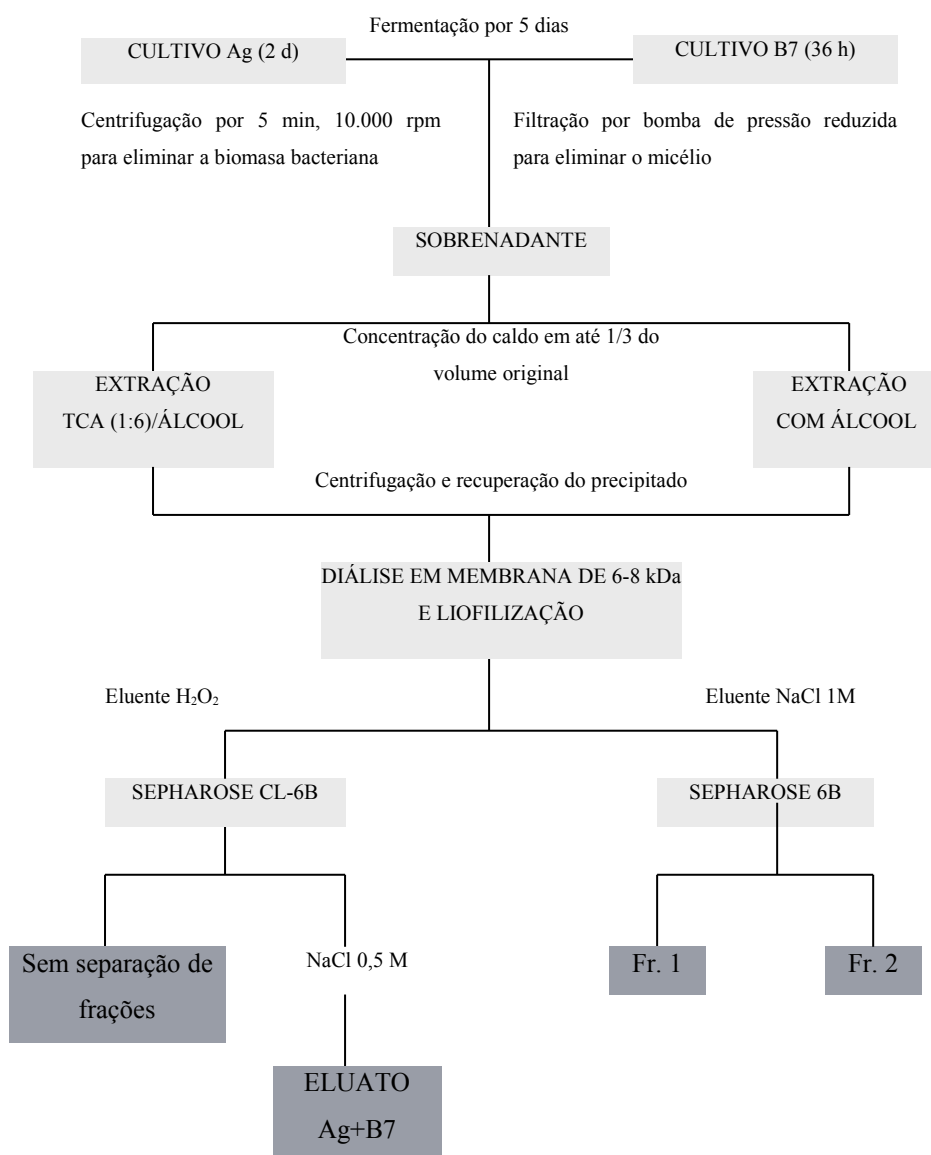
* COM1- perfil de carboidrato; ** COM2 – perfil de proteínas

O exopolissacarídeo foi solubilizado em água deuterada (D_2O) (50 mg/400 μL) e analisado a 70°C por ^{13}C RMN. Comparou-se o espectro do EPS Ag+B7 bruto com os espectros dos EPS Ag, B7 e PSH. A Figura 41 mostra que o EPS Ag+B7 é bem diferente do EPS B7 e da PSH. No entanto, muito parecido com o EPS Ag, cujos sinais são os mesmos apresentados no espectro do co-cultivo, diferindo apenas pela presença do sinal δ 103,89 na região anomérica. Assim como no EPS Ag, a presença do EPS da PSH não precipitou junto com o EPS do extraído do caldo fermentado. Certamente o *A. brasilienis* consegue degradar o EPS da soja no momento em que a glicose se esgota durante a fermentação (3º dia) e usá-lo como fonte de carboidrato ou esta fonte seja degradada pela presença de alguma enzima específica para este açúcar complexo. O espectro do EPS Ag+B7 revelou a mesma complexidade do EPS Ag, reflexo da presença de diferentes padrões de substituição. Os sinais na região anomérica δ 102,16 sugerem configuração glicosídica do tipo β e sinais mais intensos em δ 98,63 e δ 101,53 representa uma glicana com unidades em configuração α e β .

FIGURA 41 – ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C RMN: EPS Ag+B7 COM OS DEMAIS EPSs

A Figura 42 mostra o processo utilizado para obtenção das frações do EPS produzido em co-cultivo.

FIGURA 42 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EPS Ag+B7

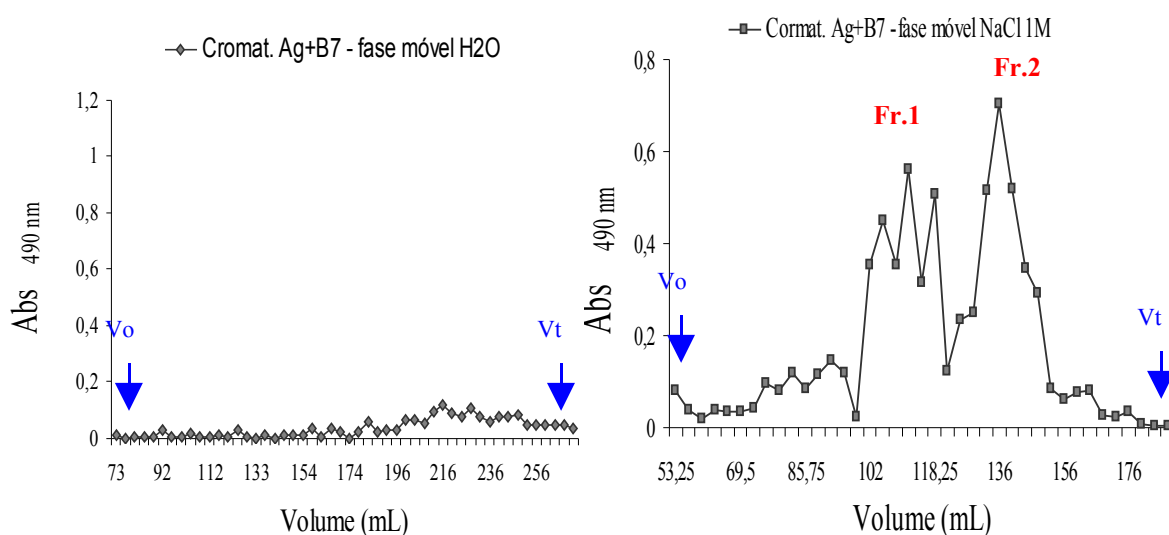


Nas etapas de purificação do EPS Ag+B7, 150 mg da amostra foram solubilizadas em 4 mL de água destilada e aplicada cuidadosamente na coluna de Sepharose CL-6B. O rendimento foi de 6,78 %, o cromatograma mostrou-se

descontínuo, sem picos de carboidrato ou separação de fração (Figura 43) e o fluxo da coluna que era de 1 mL/min passara para 0,5 mL/min, devido a absorção da amostra pelo gel. Como nas cromatografias anteriores, ao adicionar NaCl 1M, pôde-se recuperar aproximadamente 78 % o material retido. À amostra eluída chamamos de ELUATO Ag+B7.

Seguiu-se com o preparo da coluna com solução NaCl 1M e solubilização da amostra. O fluxo foi constante, mantido em aproximadamente 1,25 mL/min. A amostra desprende-se do gel com facilidade, as frações separadas foram: Fr.1 (19,3 %) e Fr.2 (18,6 %). O rendimento foi de 47,9 %. Como só foi possível separar duas frações, a cromatografia em Sepharose-6B não apresentou a mesma reprodutibilidade da cromatografia em Sephadex 6B no FPLC, cujo perfil apresentou três frações praticamente sobrepostas. Para estudos posteriores, deve-se trabalhar com diferentes tipos de géis com melhor faixa de exclusão a fim de separar as frações.

FIGURA 43 – PERFIS DE ELUIÇÃO DO EPS Ag+B7 EM SEPHAROSE CL-6B E SEPHAROSE 6B

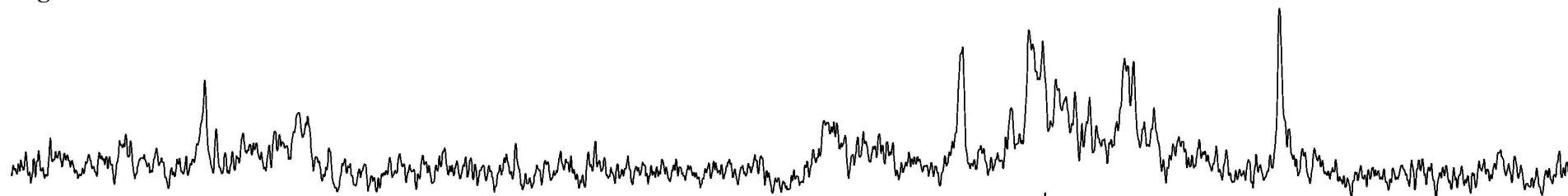
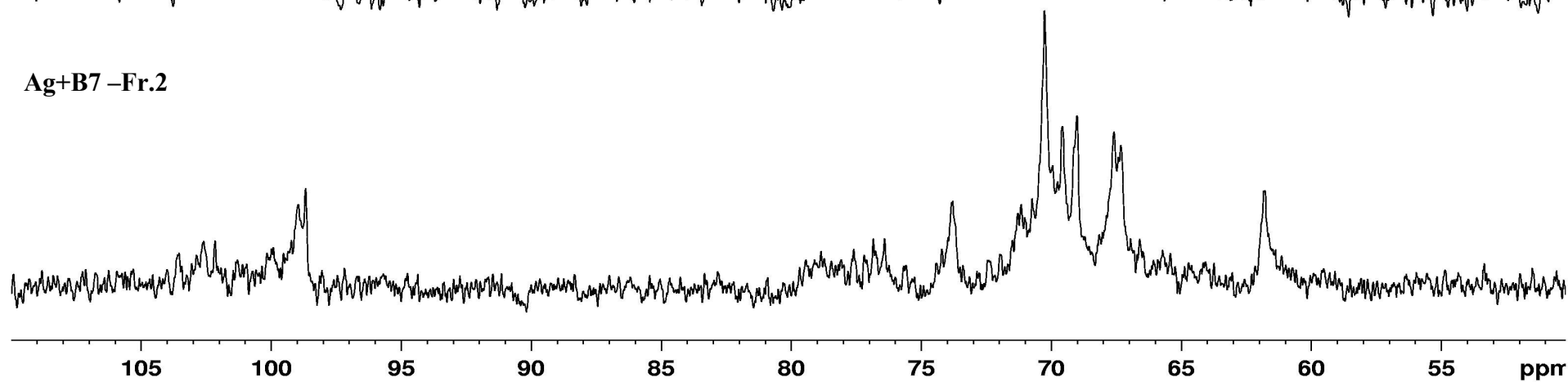


NOTA: utilizando H₂O e NaCl 1M como fases móveis, respectivamente

Espectros ¹³C RMN das frações ajudaram a melhor compreender a estrutura do EPS produzido em co-cultivo. Ainda não é possível afirmar que se trata de um novo polissacarídeo.

A fração Fr. A produzida pelo *Lb paracasei* não esteve presente na amostra. Ainda não é possível afirmar se a bactéria sofreu estresse durante a fermentação e isto inibiu a produção do biopolímero da mesma.

A diferença entre a intensidade dos sinais nos espectros ^{13}C -RMN revela que o EPS extraído do fermentado em co-cultivo possui estrutura muito similar ao EPS Ag (vide sinais na Figura 44).

FIGURA 44 – ESPECTRO COMPARATIVO ^{13}C RMN DO EPS Ag+B7 E SUAS FRAÇÕES**EPS Ag+B7****Ag+B7 -Fr.1****Ag+B7 -Fr.2**

A tabela 12 mostra a composição monossacarídica em mol% dos EPSs estudados e facilita a compreensão entre as diferentes frações obtidas. A fração solúvel do EPS produzido em co-cultivo revela presença de manose (38,9 %), xilose (20,7 %) e gactose (20,3 %). Percentagens consideráveis de xilose como um dos componentes do EPS produzido pelo fungo já foi detectado, em concentrações menores por DONG et al, 2002. A presença da xilose numa indica que houve algum tipo de alteração na composição do EPS, propondo um novo EPS, fruto da interação entre os microrganismos.

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE TODOS OS EPS ESTUDADOS E FRAÇÕES

Fração	Composição monossacarídica (mol %)*								%	
	Ram	Fuc	Rib	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Carb	Prot
Ag+B7(bruto)	3,8	5,5	2,2	1,8	20,7	38,9	20,3	6,8	91(±14)	2,9 (±0,3)
Ag (bruto)	0,9	2,6	1,3	-	6,3	55,6	23,0	10,2	98 (±2)	0,2 (±0,5)
B7 (bruto)	-	-	-	32,3	22,6	9,1	23,3	12,7	70 (±16)	8,4 (±4,5)
B7-Fr.A	33,9	-	-	-	0,6	0,5	14,1	50,9	92 (±0,5)	2 (±0,1)
PSH	-	-	-	45,2	8,7	-	38,3	7,8	55 (±6,1)	28 (±4,3)

* Monossacarídeos quantificados em GC-MS em moles % na forma de acetatos de alditóis após hidrólise ácida total, redução e acetilação

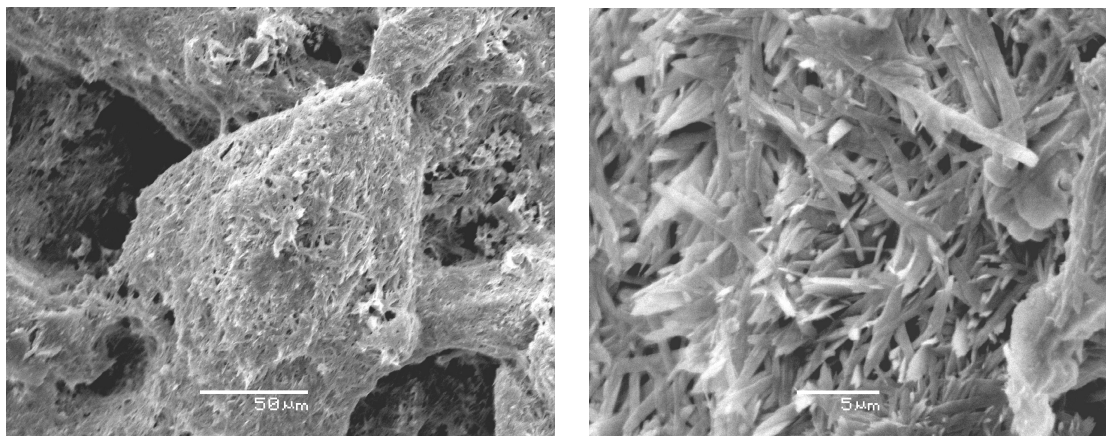
5.4 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O MEV é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 x) e resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual estamos habitualmente acostumados. Esta técnica pode ser usada para observação de exopolissacarídeos, pois, permite visualizar e analisar as estruturas micromorfológica e morométrica destes biopolímeros. Os subitens abaixo mostram as imagens morfo-estruturais dos biopolímeros estudados em aumentos de 50 µm e 5 µm.

5.4.1 Microscopia Eletrônica do EPS Extraído da Fermentação de *A. brasiliensis*

As imagens microscópicas do EPS Ag mostram uma estrutura altamente particulada e heterogênea excluindo a possibilidade de uma estrutura globular para o complexo proteico-galactomanana com solubilidade parcial (aproximadamente 90 % da amostra são solúveis).

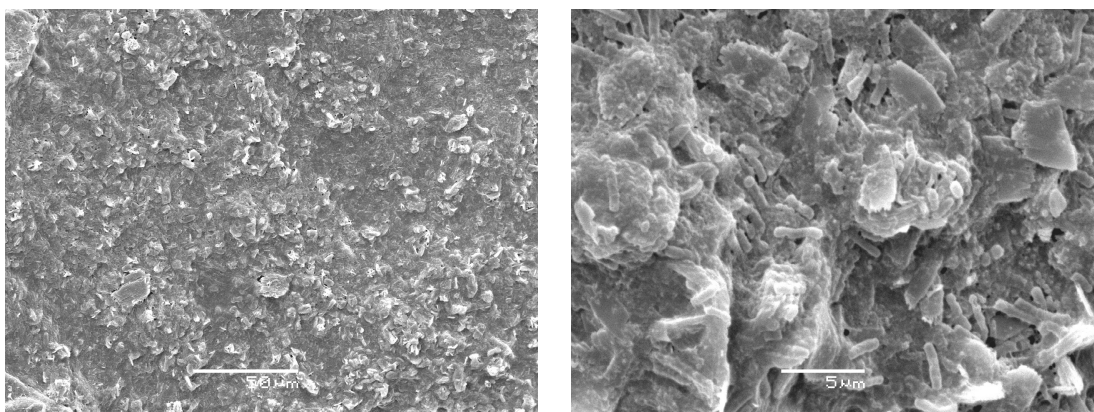
FIGURA 45 – MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DO EPS PRODUZIDO POR *A. brasilienis*



5.4.2 Microscopia Eletrônica de EPS Extraído da Fermentação de *Lb. paracasei*

As imagens obtidas pelo EPS B7 apresentam-se homogêneas, porém com uma matriz densa contrastando com o EPS Ag, já que esta amostra possui alta solubilidade. No maior aumento, é possível observar a presença de algumas bactérias que precipitaram juntamente com o EPS.

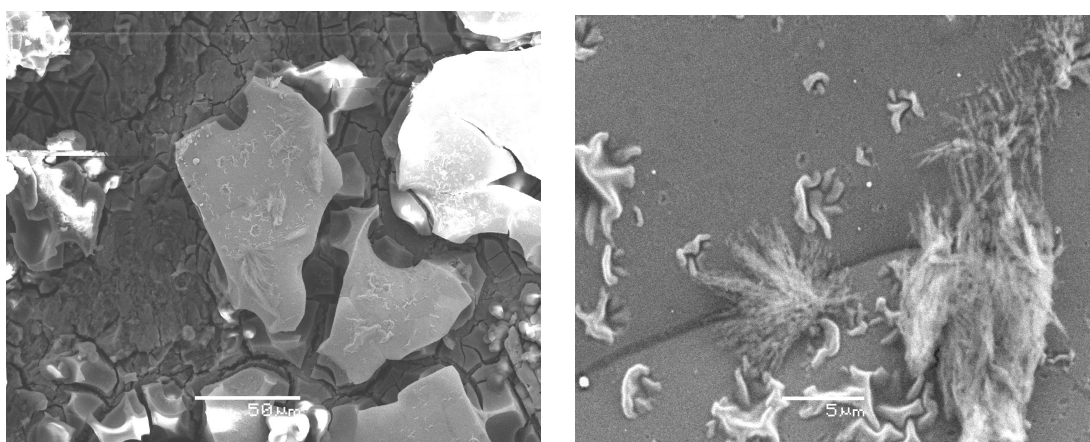
FIGURA 46 – MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DO EPS PRODUZIDO PELA FERMENTAÇÃO DE *Lactobacillus paracasei*



5.4.3 Microscopia Eletrônica do EPS Extraído da Fermentação em Co-cultivo

A observação em MEV do EPS produzido em co-cultivo (Ag+B7) apresentou uma mistura de diferentes polissacarídeos (Figura 47), muito semelhantes com as imagens dos EPSs apresentadas pelos cultivos isolados dos microrganismos (Figuras 35 e 36). No entanto, a caracterização parcial não detectou a presença de diferentes complexos de carboidratos, provavelmente, o EPS produzido pela BAL encontre-se numa proporção tão pequena a ponto de não ter sido detectada durante as análises.

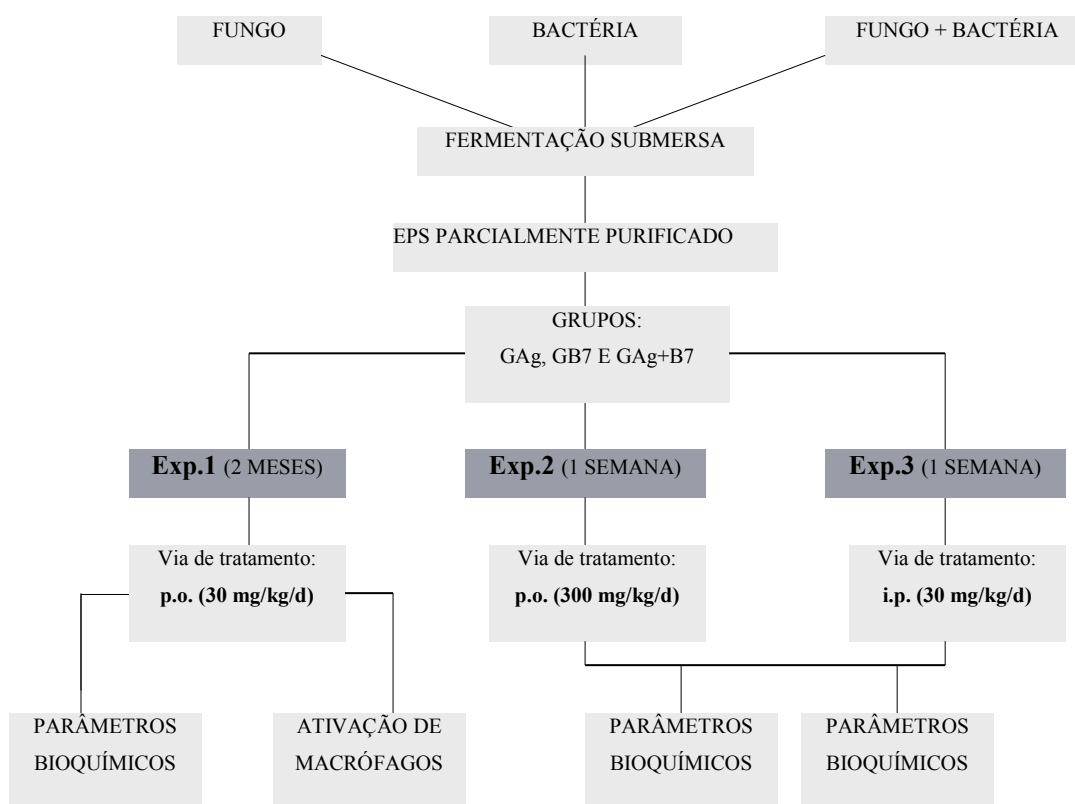
FIGURA 47 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO EPS PRODUZIDO EM CO-CULTIVO



5.5 ESTUDO BIOLÓGICO *In Vivo*

O Experimento 1 (Exp.1) foi realizado em duplicata com $n = 5$ e envolveu o estudo da ingestão de EPSs parcialmente purificados por camundongos saudáveis durante dois meses. No final do experimento foram avaliados parâmetros bioquímicos a fim de verificar a influência da ingestão do EPS no metabolismo das cobaias, assim como seu estado nutricional, imunológico ou de estresse das mesmas. Já nos Experimentos 2 e 3, também se trabalhou com $n = 5$ e envolveu cobaias comprometidas com sarcoma 180 durante 1 semana de tratamento com EPS via oral e intraperitoneal com objetivo de se comparar a eficácia entre a ingestão do EPS (p.o.) e a aplicação do EPS em forma de solução diretamente na cavidade peritoneal das cobaias (*i.p.*). Nos Exp. 2 e 3 foram analisados somente os parâmetros bioquímicos e a atividade antitumoral (Figura 48).

FIGURA 48 – FLUXOGRAMA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO EM CAMUNDONGOS SADIOS



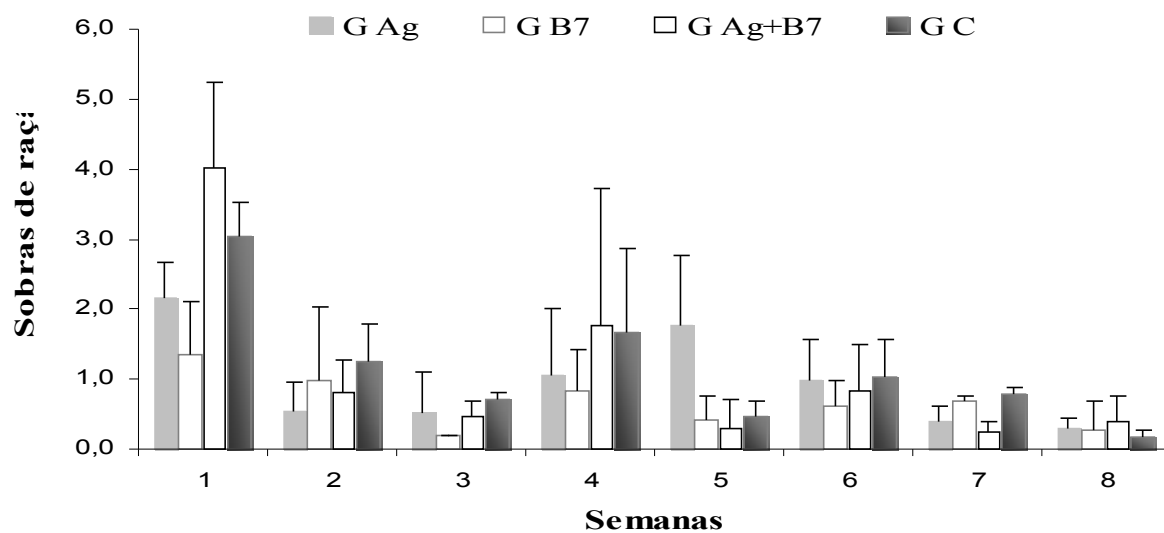
5.5.1 Experimento 1

A ração misturada ao EPS em pó (30 mg/kg/dia/cobaias) foi distribuída em formas de alumínio e depositada, aleatoriamente, nas gaiolas dos camundongos (Figura 48). Durante o experimento, tanto as sobras da ração como seu consumo foi monitorado diariamente, com a finalidade de verificar se todo o EPS estava sendo ingerido. Estatisticamente não houve diferença significativa quanto ao consumo da ração e ingestão de água entre os quatro grupos ao longo do experimento, com ingestão acima de 95 % /dia na primeira semana. Após a primeira semana, todos os grupos ingeriram valores acima de 98,6 % de toda a ração fornecida. O GB7 foi o grupo que melhor se adaptou à nova ração, - talvez o EPS da B7, conferisse algum sabor adicional ao alimento - , seguida do grupo GAg.

FIGURA 49 – DISPOSIÇÃO DAS FORMAS CONTENDO RAÇÃO NAS GAIOLAS DOS CAMUNDONGOS



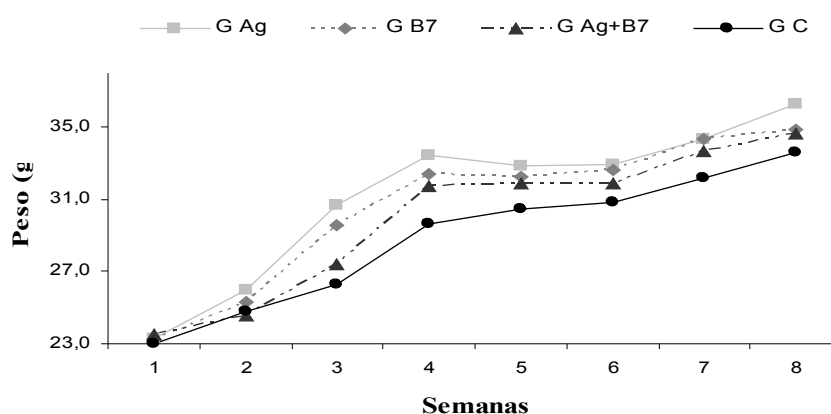
FIGURA 50 –
SOBRAS DE
RAÇÃO PELOS
GRUPOS AO
LONGO DAS 8
SEMANAS DE
ALIMENTAÇÃO



5.5.1.1 Influência da Alimentação da Ração Suplementada com EPS Sobre o Peso Corpóreo dos Camundongos

A média do peso dos grupos dos camundongos no início do experimento foi de 23 g. As cobaias foram adquirindo peso moderadamente e, no final do experimento esta média passou para $34,9 \pm 1,1$ g (Figura 51). O consumo diário de ração foi de $5,9 \pm 1$ g/camundongo. A Figura 51 mostra a variação da massa corporal dos grupos. O principal incremento de peso foi verificado no grupo GAg: $12 \pm 2,9$ % comparado ao GC (único grupo que possuiu diferença significativa em reação ao controle pós teste t ($p < 0,05$)). Este dado indica uma tendência de ganho de peso, resultado de um bom aproveitamento dos nutrientes da dieta ou por influência do EPS. As cobaias alimentadas com EPS B7 tiveram um incremento de peso de $8,6 \pm 1,4$ % e para o GAg+B7 o aumento foi de $6,9 \pm 2,7$ %. Dalla'Santa (2006) faz referência a Wroniski (2004), pesquisadores das Faculdades Evangélica em Curitiba-PR, em contradição, observaram que, durante a ingestão *in natura* do cogumelo de *A. brasiliensis* há baixa eficiência na conversão alimentar em animais, semelhante ao que ocorre com cenouras, onde a ingestão *in natura* propicia menor conversão alimentar que quando cozidas.

FIGURA 51 – EFEITO DA DIETA SUPLEMENTADA COM EPS (30mg/kg/d) NA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPÓREA DAS COBAIAS



Quanto ao consumo de água, não foi verificada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$): $60,4 \pm 10,1$ mL (GAg), $57,1 \pm 5,7$ mL (GB7), $58,6 \pm 7,2$ mL (GAg+B7) e $57,8 \pm 7,2$ mL (GC). O consumo de água por um indivíduo está intimamente relacionado ao volume corporal, tipo de alimentação, sudorese e, principalmente, à temperatura ambiente. A relação entre o consumo de água e a concentração ou diluição da urina são essenciais para a manutenção do balanço hidroeletrolítico em mamíferos (MASILAMA *et al.*, 2000 citado por Dalla'Santa, 2006). Ele está relacionado também com a concentração de sais no plasma (baixas concentrações de sódio estimulam a produção de renina, que por sua vez converte o angiotensinogênio em angiotensina na circulação). Esta estimula a produção de aldosterona que ocasiona um aumento na reabsorção de sódio e de água nos túbulos glomerulares (GUYTON, 1988). No organismo, a pressão arterial é controlada através do mecanismo “rim-líquidos corpóreos” e pelo “sistema renina-angiotensina”. O sistema de controle da pressão arterial é muito sensível, pequenas alterações originam um processo regulatório, que leva a um aumento na excreção urinária. (GUYTON, 1988).

O fungo *A. brasiliensis* tem demonstrado possuir componentes hipotensivos, de forma a promover o equilíbrio da pressão sangüínea pela sua ingestão (WATANABE *et al.*, 2002). Dentre os componentes hipotensivos estão os ácidos ganodéricos (triterpenos) ou GAS, capazes de inibir a conversão da angiotensina I em angiotensina II, a qual está relacionada com a hipertensão (MIZUNO, 2004). Em 2002, Watanabe e colaboradores relataram efeito hipotensivo de *A. brasiliensis* em ratos hipertensos. Em 2003, o mesmo basidiomiceto demonstrou efeito similar em humanos levemente hipertensos (WATANABE *et al.*, 2003). Hitoshi *et al.*, (2006) trabalharam com indivíduos hipertensos e com problemas no ciclo cardíaco e mostraram que, extrato de *Agaricus blazei* reduz da pressão arterial sistólica e diastólica durante a ingestão em longo prazo.

O leite fermentado por *Lactobacillus helveticus*, bactéria com potente atividade proteolítica, foi avaliado quanto à homeostase em modelo animal. Durante o processo de cultura, os peptídeos biogênicos *valyl-prolyl-prolina* e *isoleucyl-prolyl-prolina* foram derivados da fermentação do leite. Estes dois peptídeos possuem um

efeito inibidor sobre a enzima conversora de angiotensina, que converte a angiotensina I em angiotensina II, uma forte vasoconstritora. Resultados pré-clínicos e estudos *in vitro* sugeriram que uma parte da dose ingerida oralmente destes peptídeos pode ser absorvida intacta no trato gastrointestinal, inibindo o sistema renina-angiotensina, e conferindo significativas reduções da pressão arterial. Estes compostos ativos diminuem significativamente a pressão arterial sistólica e diastólica em indivíduos hipertensos. Em contrapartida, nenhum efeito significativo sobre a pressão arterial foi observado em normotensivos (NAKAMURA, 2004). Nada foi encontrado sobre a correlação de EPS produzido por BAL e efeito hipotensivo.

5.5.1.2 Parâmetros Bioquímicos

A tabela 13 apresenta os valores de todos os parâmetros bioquímicos, unidades e métodos utilizados no Exp.1. Os resultados são satisfatórios quanto ao benefício da ingestão dos EPSs, tanto do basidiomiceto quanto da bactéria láctica, ou mesmo do EPS produzido em co-cultivo (parâmetros discutidos adiante).

TABELA 13 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SOROLÓGICOS E PLASMÁTICOS DAS COBAIAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA NO PERÍODO DE DOIS MESES

EXAMES	VALORES				UN	MÉTODO
	GC	GAg	GB7	GAg+B7		
Glicose	156,5 ± 3,5	122 ± 3,5	82 ± 2,8	86 ± 15,6	mg/d L	Hexoquinase/G-6-PD
Uréia	31,5 ± 3,5	34 ± 3,5	40,5 ± 10,6	39 ± 1,4	mg/d L	Uréase UV
Creatinina	0,35 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,35 ± 0,1	0,35 ± 0,1	mg/d L	Jaffé
Ác. Úrico	1,7 ± 0,3	1,2 ± 0,6	2 ± 0,0	2,6 ± 0,1	mg/d L	Uricase
Proteínas totais	5,35 ± 0,4	4,9 ± 0,6	5,15 ± 0,9	5,45 ± 0,2	mg/d L	Biureto
Albumina	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,4	3,15 ± 0,6	3,4 ± 0,3	g/dL	Verde de Bromocresol
ALT (TGP)	150,5 ± 20,5	130 ± 31,8	187,5 ± 17,7	185,5 ± 53,0	U/L	NADH
AST (TGO)	46,5 ± 4,9	364 ± 4,9	60 ± 7,1	57 ± 28,3	U/L	NADH
Colesterol total	96 ± 0,0	70 ± 9,9	72 ± 12,7	78 ± 5,7	mg/d L	Enzimático/Clorimétrico
Triglicerídeos	161,5 ± 12,0	156 ± 0,7	160,5 ± 68,6	156,5 ± 7,8	mg/d L	GPO
HDL-Colesterol	58,5 ± 0,7	38 ± 4,9	39 ± 8,5	40,5 ± 4,9	mg/d L	Direto/Homogênio
LDL	mg/d L	Cálculo
VLDL	521,5 ± 12,0	510 ± 15,6	516 ± 81,3	518,5 ± 13,4	mg/d L	Cálculo
Fosfatase alcalina	55,5 ± 55,9	58 ± 59,4	54 ± 69,3	104 ± 0,0	U/L	Colorimétrico

* valores prejudicados pela alta concentração de triacilgliceróis

5.5.1.2.1 Influência da Alimentação Suplementada Sobre o Metabolismo da Glicose

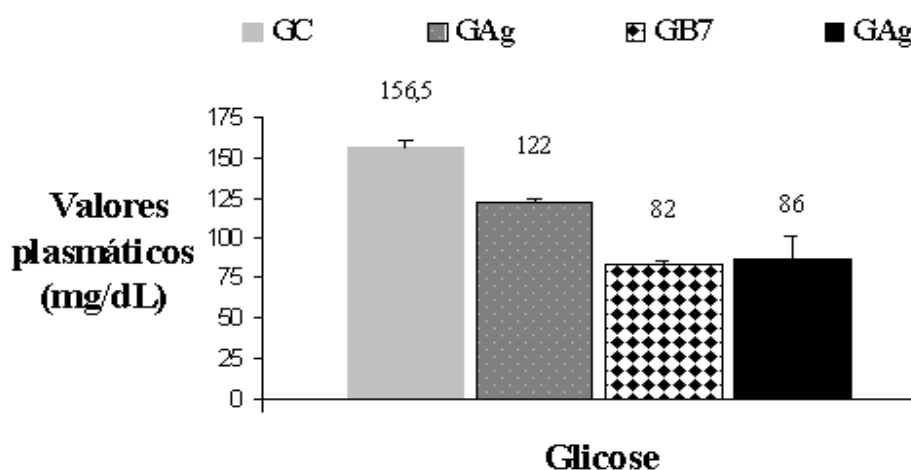
Houve significativas diferenças nas dosagens de glicose entre os grupos GAg e GAg+B7 ($p \leq 0,005$) comparados ao controle GC. Todos os EPSs utilizados no trabalho interferiram no metabolismo glicêmico do plasma sanguíneo. As baixas obtidas foram de 22,1 % para o GAg, 47,6 % para GB7 e de 45,1 % para o GAg+B7 em relação ao GC (Figura 52). Os resultados mostram que o EPS extraído do cultivo do *Lactobacillus paracasei* mostrou melhor resposta hipoglicêmica que o EPS extraído do fungo *A. brasiliensis* ou do co-cultivo. Talvez a presença do EPS da BAL, mesmo em pequena quantidade, seja suficiente para diminuir os valores da glicose plasmática, ou o EPS proveniente da PSH, seja o responsável pela queda de valor. Vale lembrar que, no item 5.3 discutiu-se a caracterização parcial dos EPSs em estudo e foi

detectada a presença de um EPS de origem vegetal (“soja”) proveniente do meio de cultivo que precipitou junto com o EPS produzido pela bactéria láctica. A revisão bibliográfica comenta sobre estudos clínicos envolvendo EPS de BAL e da soja com atividade hipoglicêmica. É de suma importância dar continuidade a esta pesquisa e avaliar o potencial de uma dieta enriquecida com estes EPSs separadamente.

A glicemia ou D-Glicose quando presente em altas concentrações no homem é indicativo de Diabetes Melitos (DM), além de beribéri, hemocromatose, pancreatite, acromegalia, hipertireoidismo, infecções agudas, tumor, epilepsia, hemorragia do miocárdio ou cerebral, além do câncer de pâncreas. Quando em baixas concentrações, pode ser consequência de hiperinsulinismo ou hiperinsulinemia, excesso de insulinoterapia, TU de pâncreas, hipotireoidismo, hepatite infecciosa, cirrose hepática, esteatose hepática, desnutrição, caquexia, drogas hipoglicemiantes, TU de hipófise (PATOLOGIA CLÍNICA, 2002). Dentre as enfermidades citadas a DM é a mais comum e a que causa maiores complicações para o indivíduo quando descompensada. O diabetes é um distúrbio do metabolismo que afeta primeiramente os açúcares (glicose e outros), mas que também tem repercussões importantes sobre o metabolismo das gorduras (lípidos) e das proteínas. Uma disfunção que, se não tratada e bem controlada, acaba produzindo, com o correr do tempo, lesões graves e potencialmente fatais como o infarto do miocárdio, derrame cerebral, cegueira, impotência, nefropatia, úlcera nas pernas e até amputações de membros. Por outro lado, quando controlada, as complicações podem ser evitadas (NOÇÕES GERAIS SOBRE O DIABETES, 2007). No Brasil, o último Censo Nacional de Diabetes foi realizado há 18 anos e, por isso, é questionado em relação a verossimilidade dos dados epidemiológicos atuais. Para a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), hoje, não há estatísticas reais sobre o número de pacientes no Brasil, mas com base em um estudo regional realizado em Ribeirão Preto pela equipe da Dra. Maria Tereza Torquato e publicado em 2003, o número estimado de brasileiros com a doença são de 10.294.200. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), no mundo, há aproximadamente 240 milhões de pessoas com diabetes - número que representa quase 6 % da população. A estimativa para 2025 é que aumente para 350 milhões. Em

2007, a entidade estimou que esta enfermidade foi responsável por 3,5 milhões de mortes globais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007).

FIGURA 52 – CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE PLASMÁTICA NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS APÓS DOIS MESES DE DIETA SUPLEMENTADA COM EPS



Rubel (2006) utilizou os mesmos parâmetros para alimentar cobaias suplementadas com ração contendo 85 % e 50 % de fermentado de *G. lucidum*, reduzindo, respectivamente, em 8,2 e 10 % os níveis de glicose dos animais em experimento. GAO *et al.* (2004) constataram atividade hipoglicêmica do produto GanopolyR (fração polissacarídica extraída de *G. lucidum* por técnica patenteada) em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo II. ZHANG e LIN (2004) reportam polissacarídeos de *G. lucidum* exercendo efeito hipoglicemiante em camundongos normais, através de um mecanismo que estimula a liberação de insulina, incrementando o influxo de Ca^{+2} nas células β pancreáticas.

Efeito da administração de *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre a pós-elevação da glicose no sangue foi investigada pelo método de tolerância em ratos Wistar machos (com oito semanas) alimentados com rações suplementadas de células liofilizadas da bactéria por 14 dias. Após a administração oral de glicose ou maltose, a elevação glicêmica no sangue foi significativamente reprimida pela ingestão de *Lb. Rhamnosus*. Estes resultados sugerem que esta BAL suprime a pós-hiperglicemia por

inibir a absorção da glicose ou devido à assimilação da glicose pelo organismo (TABUCHI *et al.*, 2005).

5.5.1.2.2 Influência da Dieta Sobre os Rins e o Fígado das Cobiaias

Dados relativos às concentrações séricas de uréias, ác. úrico, creatinina, alanina aminotransferase (TGP), aspartato aminotransferase (TGO) e fosfatase alcalina estão especificados na Figura 53. Somente o grupo GAg+B7 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle para concentração sérica de uréia. Os valores foram iguais a $34 \pm 3,5$ mg/dL (Ag), $40,5 \pm 3,5$ mg/dL (GB7) e $39 \pm 10,6$ mg/dL (GAg+B7) e $31,5 \pm 1,4$ mg/dL para o GC. Os dados estatísticos diferem dos apresentados por Dalla'Santa (2006) que trabalhou com camundongos normais, onde os valores para os grupos das cobaias alimentadas com biomassa de *A. brasiliensis* aumentou consideravelmente ($p < 0,0001$). Não houve diferenças significativas entre os valores de ácido úrico e creatinina para os grupos, mostrando normalidade ($p > 0,05$).

Quanto aos níveis séricos de TGP (GOT, AST, aspartato aminotransferase, transaminase glutâmico oxalacética) e TGO (GPT, ALT, alanina aminotransferase, transaminase glutâmico pirúvica) foram realizadas para avaliação hepato e renal. Os valores para TGP apresentaram-se mais baixos nos grupos GAg e GB7, porém dentro da normalidade. A concentração de TGP para o grupo Ag+B7 foi similar ao encontrado no GC. Houve aumento na concentração sérica de TGO para o grupo B7 ($180 \pm 14,9$ U/L) comparado ao GC ($57 \pm 28,3$ U/L), no entanto, sem diferença estatística ($p > 0,05$) em função da grande variância encontrada nas amostras. O mesmo aconteceu com a dosagem de fosfatase alcalina do GAg+B7 em relação ao controle, um aumento considerável foi notado para este grupo, porém, devido a grande variância dos dados, sem diferença estatística no intervalo de 95 % de confiança.

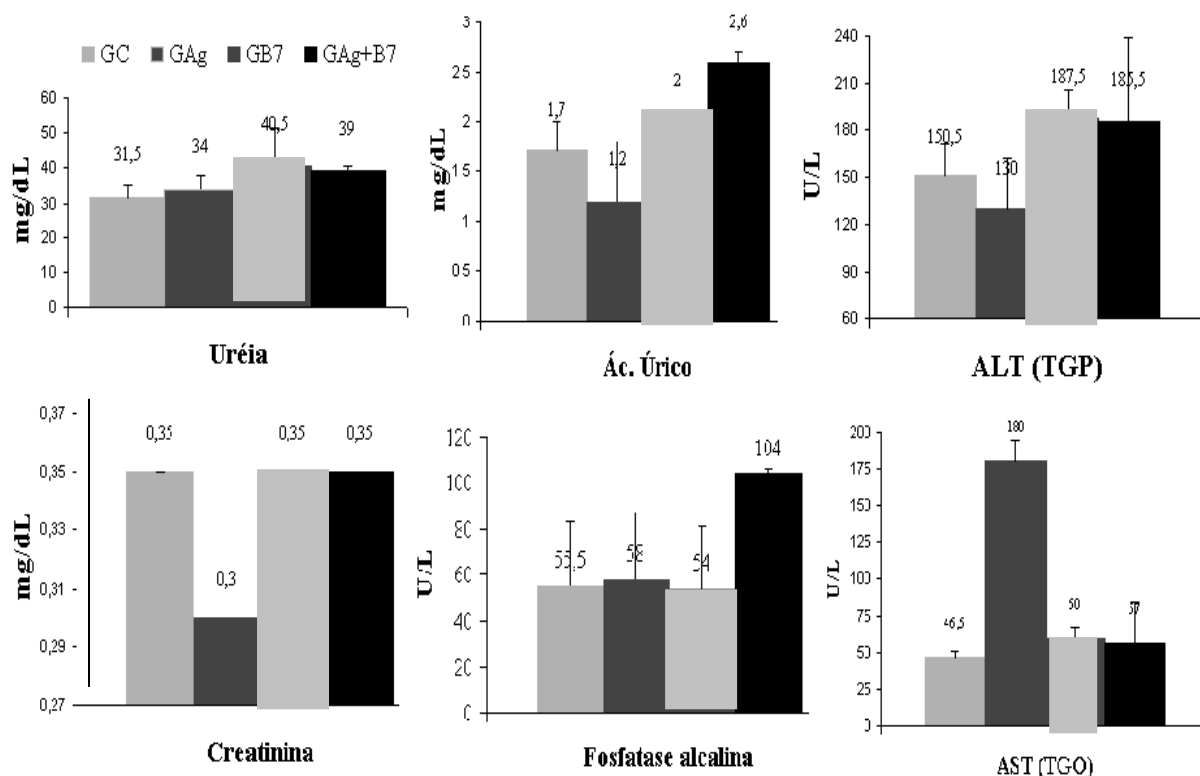
Os valores para os parâmetros bioquímicos apresentados auxiliam na interpretação da funcionalidade dos rins e fígado: aumentos consideráveis de uréia podem indicar deficiência na filtração glomerular, dieta hiperprotéica, desidratação, necrose tecidual por trauma ou infecção, anúria; enquanto sua diminuição ajuda na

interpretação da insuficiência hepática, dieta hioprotéica, anorexia nervosa, inanição, etc. A taxa de eliminação da uréia pelo organismo obedece a uma constante estabelecida por Ambard, seu cálculo possibilita a classificação da função renal em normal, hiperfuncionante ou hipofuncionante. Já o ácido úrico encontra-se aumentado em diabetes, hipercolesterolemia, hiper ou hipoparatireoidismo, jejum, insuficiência renal, S. nefrótica, glomerulonefrites, linfomas, anemias perniciosas, insuficiência hepática, artrite reumatóide, pré-eclâmpsia; sua diminuição ajuda na interpretação de alcoolismo com hepatopatia, hemocromatose, deficiência de xantina-oxidase, S. do hormônio anti-diurético inapropriado (PATOLOGIA CLÍNICA, 2002). A creatinina é uma substância filtrada pelo glomérulo, mas que não é reabsorvida pelos túbulos renais. O processo de secreção tubular da creatinina é insignificante, de modo que a quantidade excretada representa sua quantidade real filtrada. Logo, o valor real deste metabólito é importante parâmetro para avaliação da função glomerular, além de indicar nefropatias agudas ou crônicas, hipovolemia, hipertireoidismo, esforço muscular, doenças febris. Sua diminuição pode ser consequência de massa muscular reduzida: idosos, amputados, caquéticos, altitude ou regime vegetariano (BRENNER; LEVINE, 2004; PATOLOGIA CLÍNICA, 2002). Aumentos nos níveis séricos de TGP pode ser interpretado como hepatite aguda, cirrose hepática, hepatoma secundário, icterícia obstrutiva, congestão hepática infarto do miocárdio e pancreatite aguda. Para TGO aumentos podem significar infarto do miocárdio, infarto mesentérico, necrose muscular, necrose renal, infiltração hepática por linfoma e hepatomas, pancreatite aguda, choque, distrofia muscular, dermatomiosite e tuberculose (PATOLOGIA CLÍNICA, 2002). A alta concentração de TGO para o grupo B7 ($180 \pm 14,9$ U/L) poderia ser uma contra indicação para a ingestão dos EPS produzido pelos microrganismos em estudo, porém, devido à variância dos dados não foi possível afirmar tal situação. Cabe a estudo posterior a reprodutibilidade dos dados e análises histopatológicas dos órgãos.

Considerando os aspectos apresentados, podemos afirmar que os valores estão dentro dos padrões da normalidade para camundongos e que a administração oral de EPSs extraídos dos cultivos submersos de *A. brasiliensis* e *Lactobacillus paracasei* ou

do co-cultivo não causaram danos renais e hepático aparente nas cobaias durante o período de ingestão (61 semanas) na concentração de 30 mg/kg/dia/cobaia.

FIGURA 53 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA DAS COBAIAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA DURANTE DOIS MESES



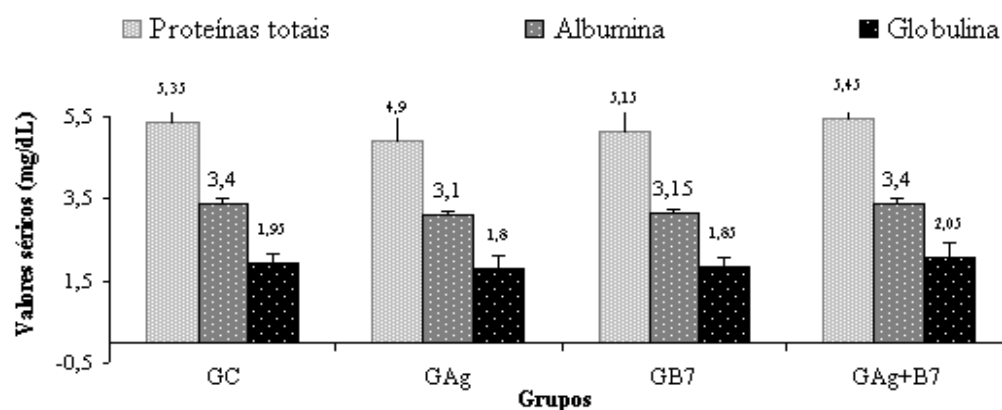
5.5.1.2.3 Influência da Alimentação Sobre o Metabolismo das Proteínas e Frações

Não houve diferença significativa quanto aos valores séricos de Proteínas Totais (PT) e frações ($p > 0,05$). Porém, no grupo GAg houve diminuição de $8,4 \pm 0,6$ % de PT, $8,8 \pm 0,4$ % de Albumina e $7,7 \pm 0,3$ % de Globulina contra o grupo GC; já no grupo GB7 a redução foi de $3,7 \pm 0,9$ % para PT, $7,4 \pm 0,6$ % para albumina e $5,1 \pm 0,2$ % globulina, (Figura 54). O grupo Ag+B7, entretanto, incrementou as dosagens em relação ao GC com aumento de 2 % para PT, 0,5 % para albumina e 5% para globulina. Seria interessante considerar o aumento das PT e frações no grupo GAg+B7 para posteriores ensaios a fim de revelar a causa deste resultado.

As proteínas plasmáticas são reguladas por um mecanismo central que obedece a equação de Ecker e Frackelton: $k = (A^{0,620}) \times (G^{0,328})$, onde A é albumina, G é

globulina e a constante k diminui em doenças e velhice. A diminuição das PTs pode indicar hipogamaglobulinemia, defeitos na síntese protéica: hepatopatias, desnutrição, hipoalbuminemia: por perda sérica, como Síndrome nefrótica e enteropatia com perda protéica. As baixas relatadas no estudo não estão associadas aos problemas citados, pois, a diminuição não foi significativa. Já o aumento da PT resulta de um processo infeccioso, cirrose biliar primária, hepatite crônica ativa, cirrose portal, reações alérgicas, crioglobulinemia, mieloma múltiplo (PATOLOGIA CLÍNICA, 2002). Os valores para PT e frações dos grupos indicam que a dieta proposta não levou a nenhuma carência protéica que pudesse comprometer a higidez orgânica dos animais, visto que, valores normais para proteínas totais séricas em camundongos *Swiss* estão entre 4,8 a 6,6 mg.dL⁻¹ (ATTA *et al.*, 1981).

FIGURA 54 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES



5.5.1.2.5 Influência da Suplementação sobre o Metabolismo Lipídico

O consumo prolongado de EPS produzido em fermentação submersa por *A. brasiliensis*, *Lactobacillus paracasei* em fermentado contendo PSH e, pelo co-cultivo influenciou de forma positiva o metabolismo lipídico das cobaias (Tabela 14), baixando para mais de 20 % as concentrações de colesterol e triacilglicerídeos. Os valores para HDL apresentaram pouco aumento, porém, com significativa diferença estatística ($p < 0,05$). A concentração de lípidos totais não pôde ser calculada devido à

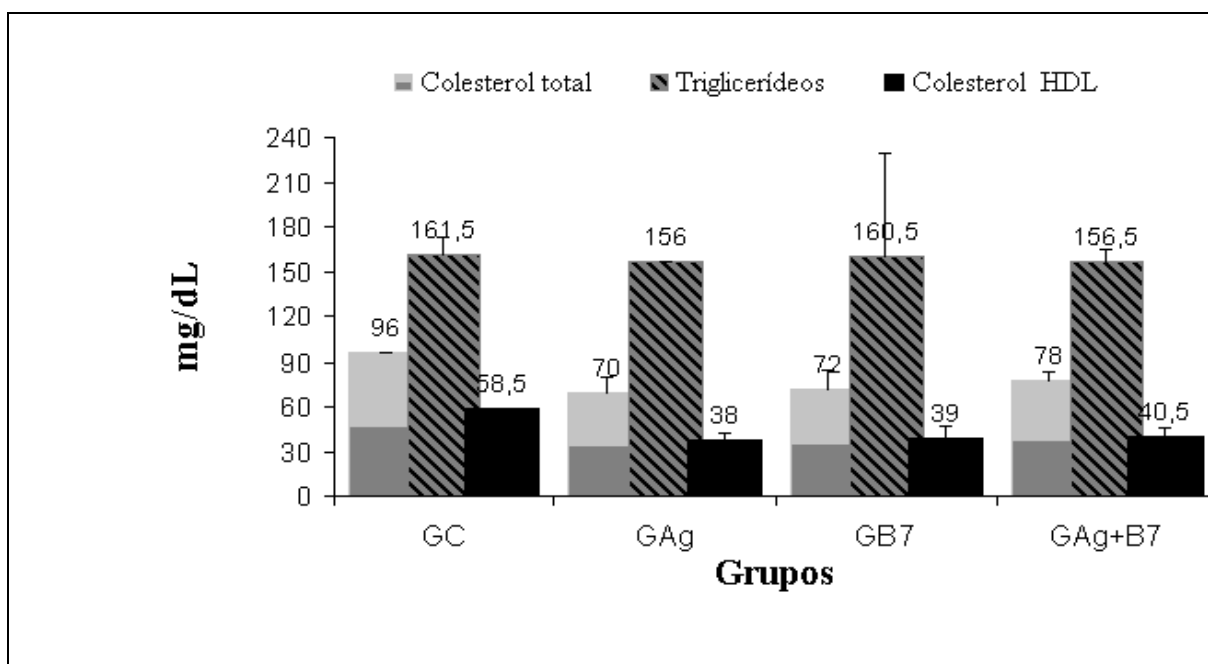
baixa concentração de LDL, provavelmente, o resultado foi prejudicado pela alta concentração de triglicérides.

TABELA 14 – EFEITO DA DIETA SUPLEMENTADA COM EPS SOBRE O METBOLISMO LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS

mg/dL	GRUPOS			
	C	Ag	B7	Ag+B7
COLESTEROL TOTAL	96 ± 0,0	70 ± 9,9	72 ± 12,7	78 ± 5,7
HDL-COLESTEROL	58,5 ± 0,7	38 ± 4,9	39 ± 8,5	40,5 ± 4,9
TRIGLICERÍDEOS	161,5 ± 12,0	156 ± 0,7	160,5 ± 68,6	156,5 ± 7,8
VLDL	521,5 ± 12,0	510 ± 15,6	516 ± 81,3	518,5 ± 13,4

Os níveis de colesterol foram significativamente reduzidos: GAg apresentou baixa de 26,1 % ($p < 0,01$) em relação ao controle, nos demais grupos a queda foi de 24 % para o GB7 e 22,1 % para o GB7+Ag ($p < 0,05$). O que mostra que todos os EPS interferiram no metabolismo lipídico das cobaias. Houve diferença significativa favorável entre os níveis de HDL ($p < 0,03$); no grupo controle o nível de HDL foi cerca de 17,9 % maior. Quanto aos níveis de triglicérides, houve redução de 3,4, 1 e 3 % para os respectivos grupos: GAg, GB7 e GAg+B7, sem diferenças estatística ($p > 0,5$) (Figura 55). O mesmo aconteceu com os resultados obtidos para VLDL.

FIGURA 55 – DOSAGEM SOROLÓGICA DE COLESTEROL E FRAÇÕES



O metabolismo lipídico normalmente mantém um equilíbrio entre biossíntese e degradação. Quando este equilíbrio é perdido pode ocorrer hiperlipidemia, como

hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. As conseqüências destas alterações são: arteriosclerose, hipertensão, obesidade, diabetes e a depressão funcional de alguns órgãos (LEE *et al.*, 2005). A hipercolesterolemia é considerada um importante fator de risco nas doenças arteriais coronárias. Os níveis de lípidos totais auxiliam no diagnóstico das lipidemias primárias e secundárias. Este exame inespecífico é a dosagem conjunta de: colesterol e suas frações, livres e esterificadas, mono, di e triglicérides, fosfolípidos, glicerol e ácidos graxos saturados e insaturados livres e esterificados. Altos níveis estão associados ao aumento do risco para infarto do miocárdio e infarto cerebral. Pesquisas apontam que concentrações elevadas de colesterol total ou de LDL-colesterol no plasma constituem importante fator de risco para o desenvolvimento de eventos ateroscleróticos (PATOLOGIA CLÍNICA, 2002). A relação de redução de 1mg.dL^{-1} de colesterol de LDLs no plasma possibilita redução de até 2 % no índice de mortalidade por cardiopatia aterosclerótica (LAW; WALD e THOMPSON, 1994). Segundo o critério das Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretrizes de prevenção de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, publicado em 2001: pacientes com Colesterol-LDL inferior a 100 mg/dL correm alto risco de desenvolver problemas cardíacos (superior a 20,0 % ou com mais de 2 fatores); pacientes com LDL inferior a 130 mg/dL, são considerados de médio risco (10,0 a 20,0% ou com 2 fatores); paciente com níveis inferior a 160mg/dL são de baixo risco e possuem 10,0% de risco com 1 fator. Os fatores de risco para a DAC são: tabagismo, hipertensão arterial superior a 140/90 mmHg, diabetes melitos, idade acima de 44 anos para os homens e acima de 54 para as mulheres, história familiar de aterosclerose precoce em pacientes de 1º grau antes dos 55 anos em homens e 65 anos em mulheres. Desta forma, é possível, estimar, em percentagem, a redução do risco de morte por problemas cardiovasculares nas cobaias em estudo (PATOLOGIA CLÍNICA, 2002).

Cogumelos comestíveis vêm sendo utilizados como alimentos nutracêuticos na prevenção da aterosclerose, devido ao seu alto conteúdo de fibras, proteínas, microelementos e, principalmente, baixo conteúdo de gorduras. As substâncias com atividade hipocolesterolêmica são encontradas tanto no micélio quanto no corpo de

frutificação de diversos cogumelos como, por exemplo, *Auricularia auricula-judae* e *Tremella fuciformis*, *Polyporus confluent*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea* e *Lentinus edodes* (CHEUNG, 1996a,b (SUGIYAMA *et al.*, 2000; KABIR, YAMAGUCHI e KIMURA, 1987; KUBO e NANBA, 1996; 1997; OPLETAL *et al.*, 1997; GUNDE-CIMERMAN e PLEMENITAS, 2001; BOBEK, OZDIN e KUNIAK, 1996; BOBEK, GALBAY, 1999; CHEUNG, 1998; KABIR, YAMAGUCHI, KIMURA, 1987; SUGIYAMA, YAMAKAWA, SAEKI, 1997 citados por DALLA'SANTA, 2006). Os dados obtidos em nosso estudo, com redução nos diversos parâmetros lipídicos corroboram os resultados de pesquisas onde a ingestão oral do corpo de frutificação e do micélio de *A. brasiliensis* adicionado com ácido S- aminobutírico ocasionou uma redução na concentração sérica do colesterol total e triacilgliceróis em ratos, com índices aterogênicos aumentados (WATANABE *et al.*, 2002). As β -glicanas e oligosacarídeos obtidas do corpo de frutificação de *A. brasiliensis* também resultaram em decréscimos na concentração sérica do colesterol total, triacilgliceróis e no fator de risco de problemas cardiovasculares em ratos, com concomitante aumento no HDL (KIM *et al.*, 2005). Este efeito redutor nas concentrações dos lipídeos totais, colesterol-total e dos triacilgliceróis também foi observada em coelhos, após a ingestão do extrato de *A. brasiliensis* (ITO, 2004). Dalla'Santa (2006) alimentou camundongos com uma ração suplementada com 29 e 14,5 % de micélio de *A. brasiliensis* e cuja redução nos níveis de colesterol foi de 29 e 14,5 %. Rubel (2006) demonstrou redução de 4 e 17 % nos níveis de colesterol e, 3,4 e 1 % nos níveis de triglicérides em camundongos alimentados com ração enriquecida com 80 e 50 % de *G. lucidum*, respectivamente.

Tanto as bactérias lácticas como alguns cogumelos comestíveis possuem atividade hipocolesterolêmica, porém o modo de ação ainda não foi totalmente elucidado. Este experimento mostrou que houve redução no nível de colesterol e triglicérides devido à ingestão em longo prazo de exopolissacarídeos de *A. brasiliensis*, *Lb. paracasei*.

5.5.1.3 Atividade dos Macrófagos Peritoneais

Todos os testes para a análise da atividade dos macrófagos foram feitos em duplicata com n=5, o resultado da média foi apresentado.

a) Produção de Ânion Superóxido

A produção de ânion superóxido (Figura 56), formada através da oxidação da NADPH oxidase na mitocôndria, está aumentada no grupo Ag em comparação ao controle (p<0,03), uma diferença de $3,02 \pm 0,5$ e um aumento significativo. Os outros grupos, no entanto, tiveram valores abaixo do grupo controle, ou seja, não influenciaram na atividade dos macrófagos para a produção deste ânion.

A produção de NADPH oxidase é a primeira defesa contra agentes invasores. Quanto um fagócito é estimulado, esta enzima migra para a membrana celular, associando-se a ele e tornando-a ativa. A enzima então transfere elétrons de seu substrato, NADPH, para o oxigênio gerando o ânion superóxido, conforme reação abaixo. Este ânion é produzido dentro das vesículas do fagossoma sendo rapidamente convertido em espécies mais reativas, destruindo o microrganismo fagocitado (CURI *et al.*, 2002 e ZHANG *et al.*, 2004).

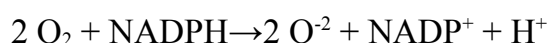
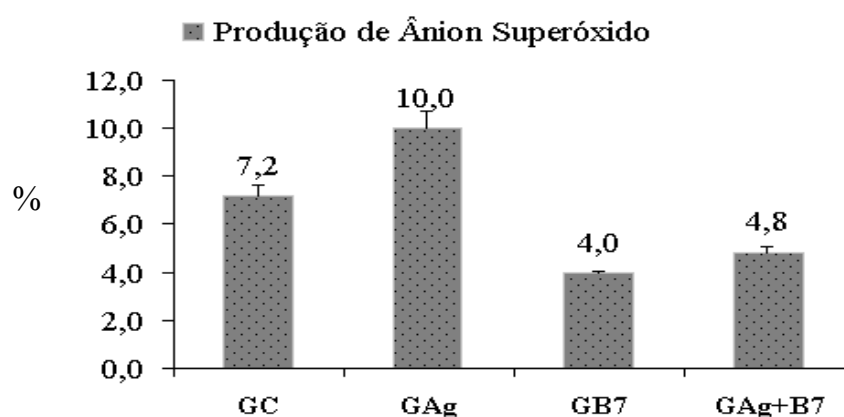


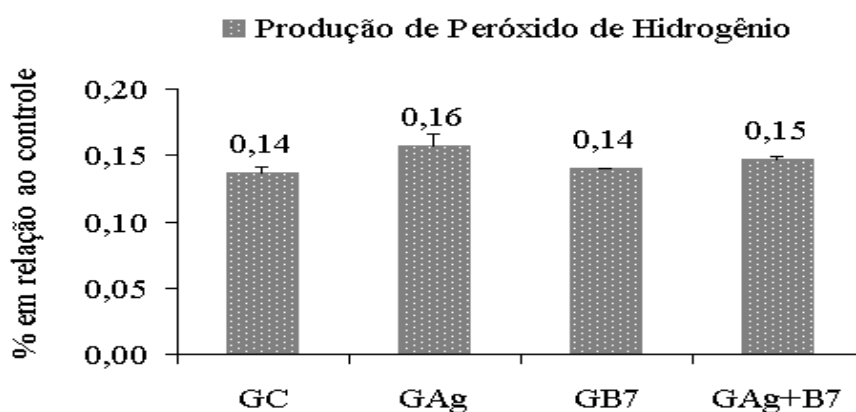
FIGURA 56 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELOS MACRÓFAGOS



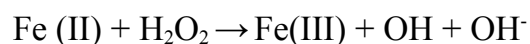
b) produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio não apresentou diferenças ou aumentos significativos após análise estatística ($p > 0,05$) devido à pequena variância dos dados. O método utilizado apresentou valores maiores no GAg de 2 vezes em relação ao GC.

FIGURA 57 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PELOS MACRÓFAGOS DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM EPS

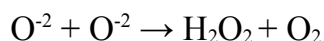


Quando um ânion superóxido reage com outro superóxido, tem-se a formação de uma substância estável, o peróxido e hidrogênio (H_2O_2). Quando este H_2O_2 reage com uma molécula de ferro ele ganha mais um elétron, formando um radical livre chamado hidroxila (OH).



O radical hiroxila pode danificar a membrana ou partes internas da célula, modificar proteínas, como colágeno e elastina e ainda provocar alterações nos ácidos nucléicos (FRIDOVICH, 1998). A enzima peróxido de hidrogênio dismutase (SOD) catalisa a reação entre os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, conforme a reação:



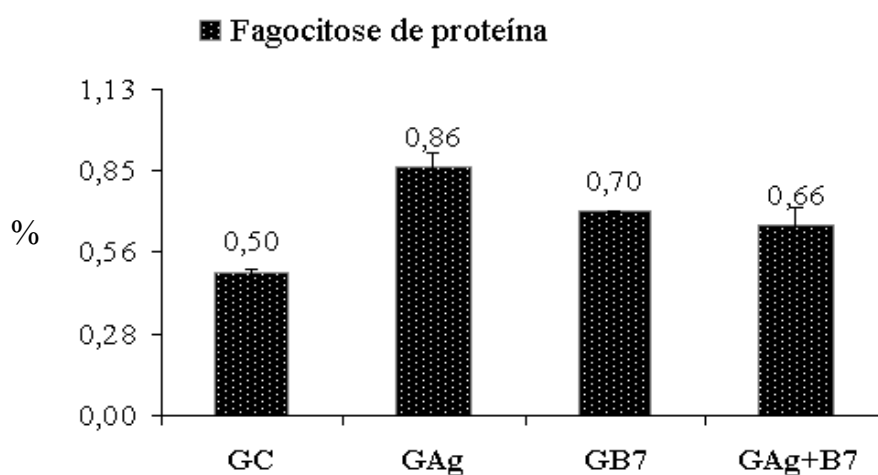


SOD

C) Índice de fagocitose nos Macrófagos Peritoneais

Outra resposta imunitária importante é o índice de fagocitose dos macrófagos peritoneais residentes. Nos grupos suplementados com EPSs, houve um aumento significativo no nível de fagocitose em todos os grupos comparados ao controle (Figura 58); a análise estatística para o grupo Ag apresentou um aumento de 36 % ($p < 0,01$), no GB7 este aumento foi de 20% ($p < 0,03$) e para o grupo Ag+B7 apenas 16%, mas com diferença significativa para o teste t ($p < 0,05$) devido à análise de variância.

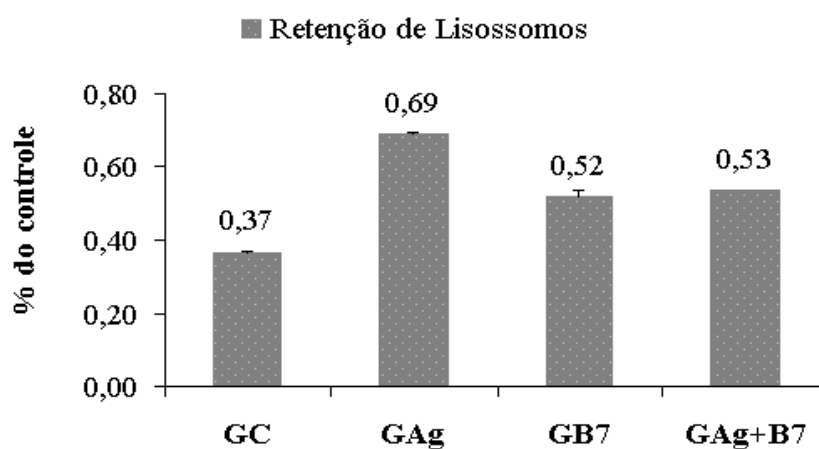
FIGURA 58 – ÍNDICE DE FAGOCITOSE NOS MACRÓFAGOS DAS COBAIAS SUPLEMENTADOS COM EPS



d) Retenção de Lisossomos pelos Macrófagos

Os níveis de retenção de lisossomos pelos macrófagos do grupo GAg aumentou de 32 vezes em comparação ao controle; para o GB7 este aumento foi de 15 % e o Grupo Ag+B7 de 16 %, a significância para todos os grupos foi de 98,7 %. Entre os grupos, o GAg apresentou maior retenção que o GB ($p < 0,009$) e que o GAg+B7 ($p < 0,01$). Vide figura 59.

FIGURA 59 – ÍNDICE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS PELOS MACRÓFAGOS DOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM EPS

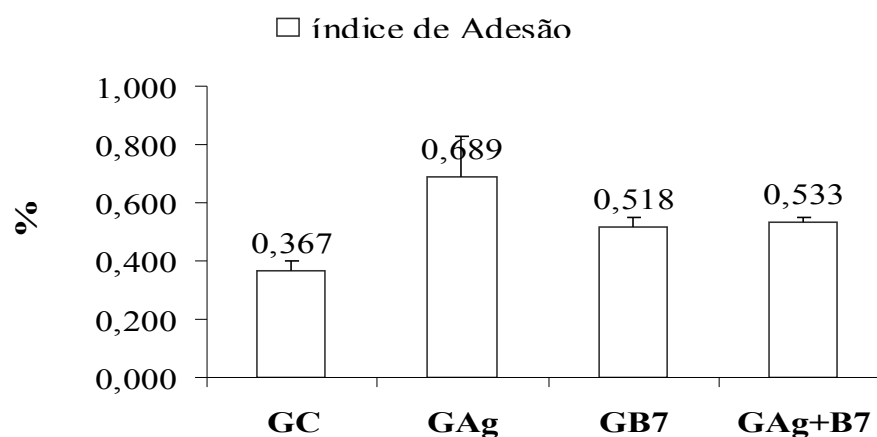


Os neutrófilos e monócitos possuem grânulos lisossômicos que quando liberados podem contribuir para a resposta inflamatória. Os macrófagos possuem também enzimas lisossômicas, as hidrolases ácidas, as collagenases e as elastases. As hidrolases ácidas têm a função de destruir bactérias e restos de materiais em pH ácido, dentro dos lisossomos. As collagenases e as elastases são capazes de degradar vários constituintes extracelulares como o colágeno, a membrana basal, a elastina e a cartilagem causando destruição tissular (ROIT *et al.*, 1994). Houve maior retenção nos animais suplementados com EPS de *A. brasiliensis* em relação ao controle.

e) Adesão pelos Macrófagos

O nível de adesão é também um importante parâmetro para se avaliar a atividade macrofágica. A diferença no nível de adesão dos macrófagos pelos grupos foi significativamente diferente ao controle: ($p < 0,03$) para o GAg, aumento de 32 %, ($p < 0,01$) para o GB7, 15 % e ($p < 0,001$) para o grupo Ag+B7, 16 %. E não houve significativas diferenças entre os grupos alimentados com ração suplementada. Estes resultados concordam plenamente com o teste de retenção de lisossomos. Já que ambos estão envolvidos no processo de defesa do organismo pelos macrófagos.

FIGURA 60 – ÍNDICE DE ADESÃO DOS MACRÓFAGOS NOS GRUPOS SUPLEMENTADOS COM EPS



De acordo com as figuras acima, o grupo de camundongos suplementados com EPS de *A. brasiliensis*, *Lb paracasei* misturado ao EPS de origem vegetal e o EPS originário do co-cultivo entre os microrganismos conferiram maior atividade macrofágica contra patógenos que possam vir a acometer as cobaias.

Estudos acerca dos mecanismos de ação de substâncias cuja presença já foram detectadas em no *Agaricaceae*, demonstraram importância na resposta imunitária e hematológica. Demonstrou-se que a 1-3-beta-D-glicana possui efeitos sobre o sistema imunitário, tais como: aumento da imunidade celular e humoral, aumento do número, tamanho, atividade fagocitária, aumento na aderência e quimiotaxia dos macrófagos; aumento do número de monócitos circulantes, aumento da produção de antígenos e atividade citolítica sobre células tumorais humanas *in vitro* (TAKAKU, KIURA e OKUDA, 2001; JENNEMAN *et al.*, 1999; 8. TAKESHI, YOSHIYUKI, HIROMICHI, 2001). A administração de *Lactobacillus casei* também foi relacionada com a indução da resposta antitumoral mediada por células T e pela ativação de macrófagos (KATO *et al.*, 1988). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002). A administração de *Lactobacillus casei* protegeu camundongos contra patógenos intestinais pela indução do aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (KATO *et al.*, 1983).

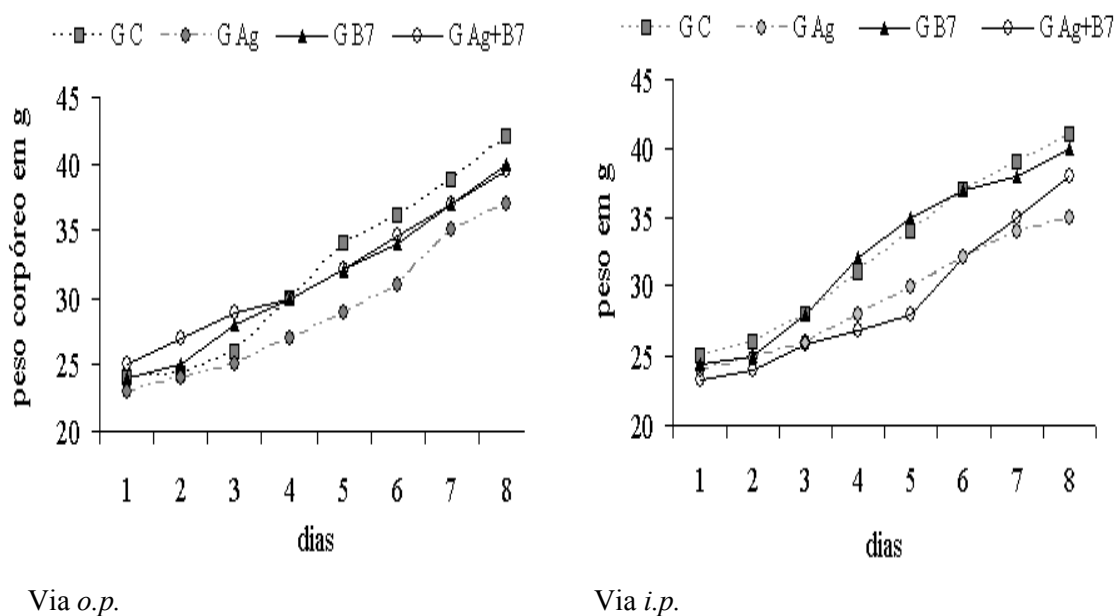
5.5.2 Experimentos 2 e 3

O experimento 2 suplementou oralmente (*o.p.*) camundongos com 300 mg de EPS/kg/d, enquanto o experimento 3 administrou via intraperitoneal (*i.p.*) 30 mg de EPS/kg/dia durante 1 semana. O sarcoma 180 foi enxertado 24 h antes da suplementação. A mistura da ração com EPS em pó foram distribuídas em formas e depositadas nas gaiolas dos camundongos (Figura 48). Durante todo o experimento, as sobras da ração e o consumo da água foram monitorados. Estatisticamente não houve diferenças quanto ao consumo da ração e ingestão de água entre os grupos e a via de administração dos EPSs.

5.5.2.1 Influência da Administração Oral e Intraperitoneal dos EPSs Sobre o Peso Corpóreo dos Camundongos

A média do peso nos grupos dos camundongos no início do experimento foi de 24 g, no final passou para $40,1 \pm 4,2$ g (Figura 58). O ganho de peso observado foi devido ao acúmulo de líquido ascítico e proliferação das células cancerígenas do Sarcoma 180, levando a um ganho de peso de aproximadamente 3 a 4 g em um único dia. As cobaias apresentaram sintomas de caquexia. O grupo GAg conteve significativamente o peso 37 g via *o.p.* e 35,1 g via *i.p.* ($p < 0,05$), enquanto o controle apresentou 42,3 g via *o.p.* e 41 g via *i.p.* No Exp.2 (via *i.p.*) o grupo Ag+B7 apresentou níveis de retenção de peso similar ao GAg ($p < 0,05$) (Figura 61). Pode-se dizer que a administração via *i.p.* foi mais eficaz quanto à redução da ascite que a via *o.p.*

FIGURA 61 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL (300 mg/kg/d) E INTRAPERITONEAL (30 mg/kg/d) DOS EPSs SOBRE O PESO DAS COBAIAS COMPROMETIDAS COM SARCOMA 180



Quanto ao consumo de água, não foi verificada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), sua ingestão foi constante ao longo do experimento, mantendo-se em $58,4 \pm 11,1$ mL/dia.

5.5.2.2 Parâmetros Bioquímicos

A tabela 15 correlaciona os valores obtidos pelos parâmetros bioquímicos no soro e plasma das cobaias durante o Exp.2 e 3. Os resultados são satisfatórios quanto ao benefício da ingestão dos EPSs, tanto de basidiomiceto quanto da bactéria láctica, ou mesmo do EPS produzido em co-cultivo.

TABLEA 15 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SOROLÓGICOS E PLASMÁTICOS DAS COBAIAS ADMINISTRADAS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL DE EPS

EXPERIMENTO VIA INTRAPERITONEAL 30mg/Kg/d					EXPERIMENTO VIA ORAL 600mg/kg/d				UM	MÉTODO
EXAMES	VALORES				VALORES					
	GC	GAg	GB7	GAg+B7	GC	GAg	GB7	GAg+B7		
Glicose	156 ± 4,5	108±2	135 ± 3,4	121±5	145 ± 2,0	132 ± 3,5	137 ± 4,2	124 ± 3,5	mg/dL	hexoquinase/G-6-PD
Uréia	61 ± 1,3	83,5±7,8	113 ± 9,9	91±6	56 ± 6,1	73 ± 6,0	37 ± 0,2	52 ± 0,7	mg/dL	Uréase UV
Creatinina	0,3 ± 0,2	0,4±0,15	0,4 ± 0,2	0,3±0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	mg/dL	Jaffé
Ác. Úrico	2,3 ± 0,1	3±0,2	2,8 ± 0,0	3,4±0,1	2,5 ± 0,3	4,1 ± 0,5	2 ± 0,3	5,1 ± 0,3	mg/dL	Uricase
Proteínas totais	4,7 ± 0,4	4,6±0,3	4,8 ± 0,4	4,7±0,2	4,1 ± 1,0	4,7 ± 4,0	4,2 ± 0,42	4,9 ± 0,3	mg/dL	Biureto
Albumina	2,4 ± 0,3	2,5±0,4	2,4 ± 0,6	2,1±0,3	2,2 ± 0,5	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	g/dL	verde de Bromocresol
ALT (TGP)	129 ± 21	120±42	115 ± 3,5	158±30	118 ± 15,5	124 ± 25,5	112 ± 23,1	141 ± 44,2	u/L	NADH
AST (TGO)	16 ± 8,5	19±0	15 ± 14,9	20±13	17 ± 8,3	21 ± 12,3	20 ± 11,2	21 ± 31,5	u/L	NADH
Colesterol total	143 ± 3,2	124±12	108 ± 16	118	159 ± 3,5	134 ± 7,8	127 ± 2,9	141 ± 0,1	mg/dL	Enzimático/Clorimétrico
Triglicerídeos	1044 ± 26	523±41	459 ± 0,8	513	1116 ± 52,3	947 ± 2,1	481 ± 11,1	658 ± 3,4	mg/dL	GPO
HDL	*	*	25 ± 0,8	33	*	*	20 ± 0,5	27 ± 0,7	mg/dL	Direto/Homogênio
LDL	*	*	*	*	*	*	*	*	mg/dL	Cálculo
VLDL	209 ± 42	100±32	92 ± 20,4	103 ± 15,5	223 ± 4,5	189 ± 9,8	96 ± 12,0	132 ± 21,0	mg/dL	Cálculo

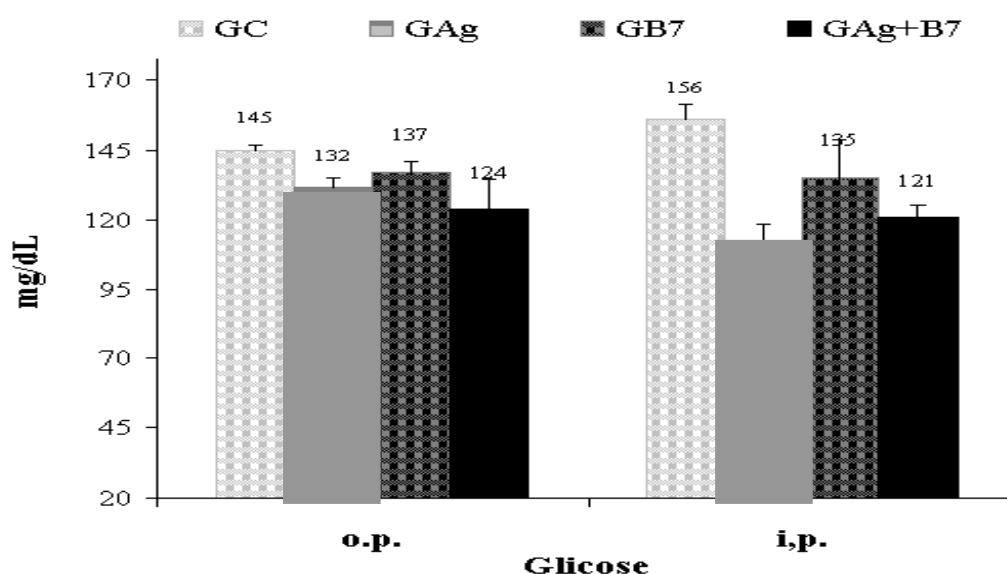
* Resultado prejudicado pela alta concentração de triglicerídes

5.5.2.2.1 Influência da Dosagem de EPS Via Oral e Intraperitoneal Sobre o Metabolismo da Glicose

Na administração via oral (300 mg/kg/d) houve redução de 14,5 %. Nos valores para glicose, com diferença significativa para o grupo GAg+B7 ($124 \pm 3,5$) e GC (145 ± 2) ($p < 0,002$). Os demais grupos, apesar da redução, não houve diferença significativa ($p > 0,1$). Já na administração via *i.p.* todos apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose: GAg apresentou baixa de $50 \pm 2,5$ ($p < 0,002$), o GB7 $22,2 \pm 1,2$ ($p < 0,005$) e o GAg+B7 $35 \pm 0,7$ ($p < 0,004$). Dentre os grupos, houve diferenças para GAg e o GB7 ($p < 0,01$), e para o GAg e o GAg+B7 ($p < 0,02$) e entre ainda para o GB7 e GAg+B7 ($p < 0,01$).

Os resultados demonstram que a via *i.p.*, na dose de 30 mg/ kg, foi mais eficaz que a via *o.p.* na dose de 300 mg/kg. No entanto a suplementação oral durante 2 meses de uma dose de 30 mg/kg (Exp.1) reduziu os níveis de glicose comparada aos valores apresentados nos EXp. 2 e 3. Com isto, pode-se afirmar que a ingestão de EPS em longo prazo ou por via intraperitoneal, em curto prazo, beneficia a saúde do indivíduo reduzindo o risco de desenvolver um DM concordando com estudos de nível científico-acadêmico sobre atividade biológica envolvendo cogumelos comestíveis e bactérias lácticas (supostamente o mecanismo de ação do EPS do *Lactobacillus* seja similar ao descrito por Tabuchi e colaboradores (2005): por supressão ao inibir a absorção da glicose ou devido sua assimilação pelo organismo). A presença de um EPS da soja junto com o EPS produzido pela bactéria láctica pode ter conferido a atividade hipoglicemiante, visto que, já existem estudos clínicos envolvendo este EPS no tratamento da hiperglicemia.

FIGURA 62 – CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PLASMÁTICA NOS GRUPOS QUE RECEBERAM EPS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL



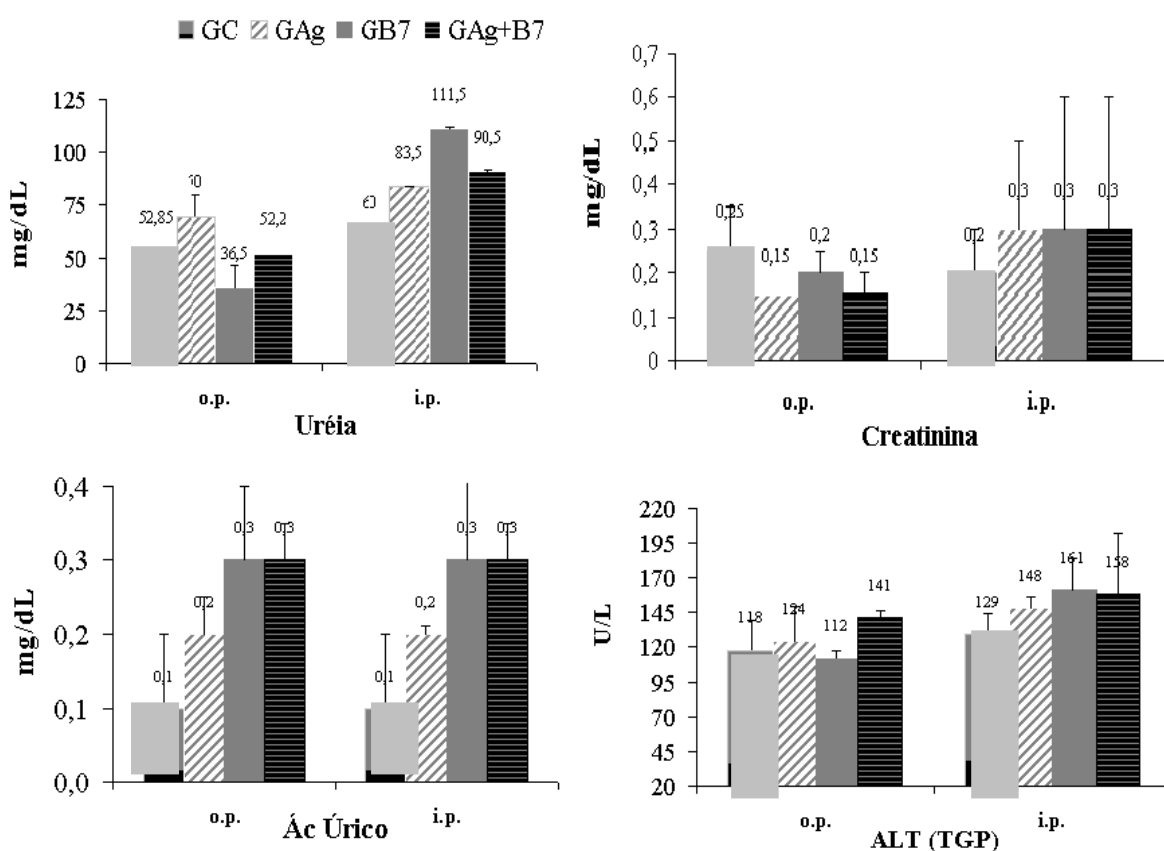
5.5.2.2.2 Análise da Influência da Administração de EPS Via Oral e Intraperitoneal Sobre Rins e Fígado das Cobaias

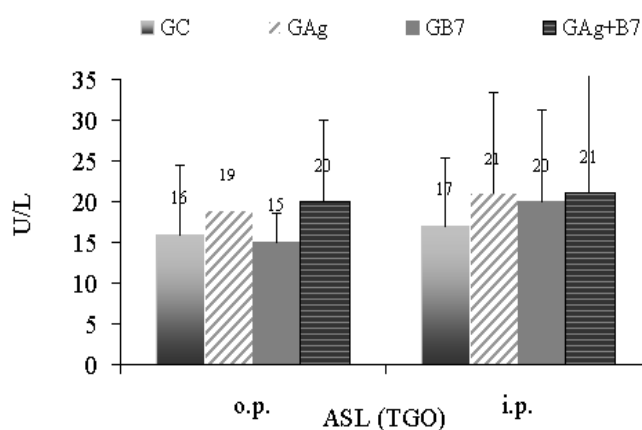
Dados relativos às concentrações séricas de uréias, ác. úrico, creatinina, alanina aminotransferase (TGP), aspartato aminotransferase (TGO) e fosfatase alcalina estão especificados na Figura 63. As concentrações séricas de uréia para a administração via *o.p.* foram significativamente menores que os valores apresentados via *i.p.* No exp.2 (*o.p.*) o GAg não apresentou diferença estatística quando comparada ao GC ($p > 0,05$) devido à grande variância; no entanto apresentou diferenças entre os demais controles ($p < 0,03$), as diferenças nos níveis sorológicos foram de: $15 \pm 4,8$ (entre GAg e GC), $17,78 \pm 3,7$ (entre o GB7 e GC). Não houve diferenças para o Gg+B7 ($p > 0,5$); No EXp.3 (*i.p.*) os valores de todos os grupos aumentaram significativamente: $21,2 \pm 2,7$ no GAg ($p < 0,01$), $58,6 \pm 6,7$ no GB7 ($p < 0,01$) e $36,8 \pm 1,8$ no GAg+B7 ($p < 0,003$). Os valores para o ácido úrico, creatinina e TGP observa-se que os valores para a via de administração de EPS oral são menores que os da via intraperitoneal. Os valores para creatinina não apresentaram diferença significativa. Já os valores de ácido úrico foram significativamente maiores para todos os grupos em relação ao controle, porém, devido à grande variância dos dados, sem diferença estatística ($p > 0,1$). Os níveis séricos de TGP (GOT, AST, aspartato aminotransferase, transaminase glutâmico

oxalacética) e TGO (TGP, GPT, ALT, alanina aminotransferase, transaminase glutâmico pirúvica) não apresentaram diferença estatística frente ao intervalo de confiança de 95 %. O aumento de TGO encontrado no grupo GAg (Exp. 1), que envolveu camundongos normais não foram reproduzidos nos Exp. 2 e 3.

Frente aos dados apresentados, pode-se afirmar que os valores estão dentro dos padrões da normalidade para camundongos e que a administração oral e intraperitoneal de EPS, na dose de 300 mg/kg/d e 30 mg/kg/d, respectivamente, extraídos do cultivo submerso, tanto de *A. brasiliensis* quanto de *Lactobacillus paracasei* ou do co-cultivo não causaram danos renais e/ou hepático aparentes durante a administração de uma semana.

FIGURA 63 – DOSAGENS SÉRICA DE URÉIA, ÁC. ÚRICO, CREATININA, TGO, TGP E FOSFATASE ALCALINA PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA DAS COBAIAS ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM EPS DURANTE 2 MESES

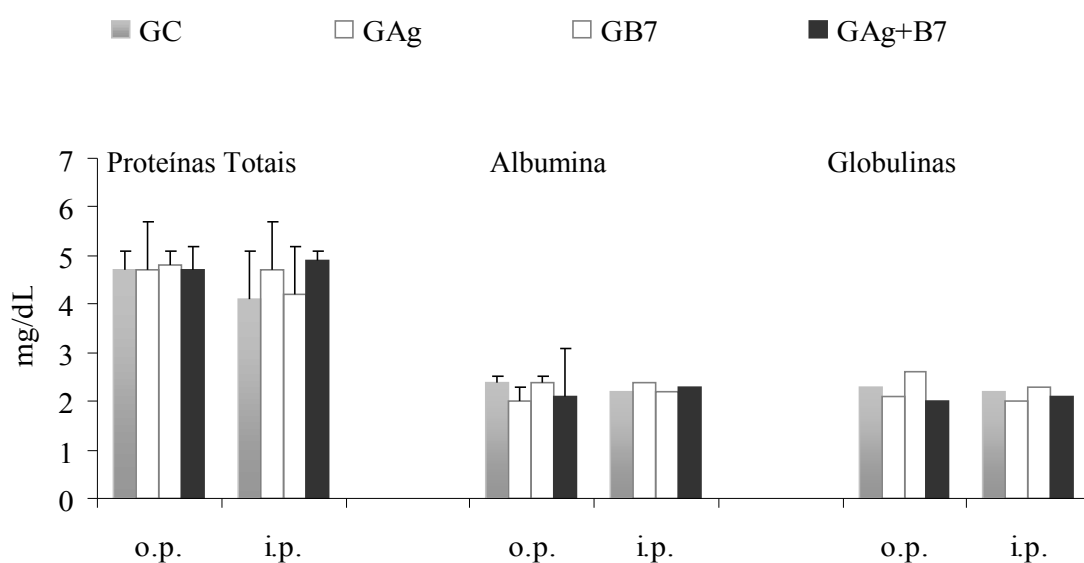




5.5.2.2.3 Influência da Administração de EPS Via Oral e Intraperitoneal sobre o Metabolismo das Proteínas e Frações

Não houve diferença significativa quanto aos valores séricos de Proteínas Totais (PT) e frações ($p > 0,05$) nem entre a administração via *o.p.* e *i.p.* dos grupos (Figura 64). Os valores e os resultados da análise frente ao teste t foram similares aos observados no experimento 1 que envolveu camundongos normais.

FIGURA 64 - INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE EPS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL SOBRE O METABOLISMO DAS PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES

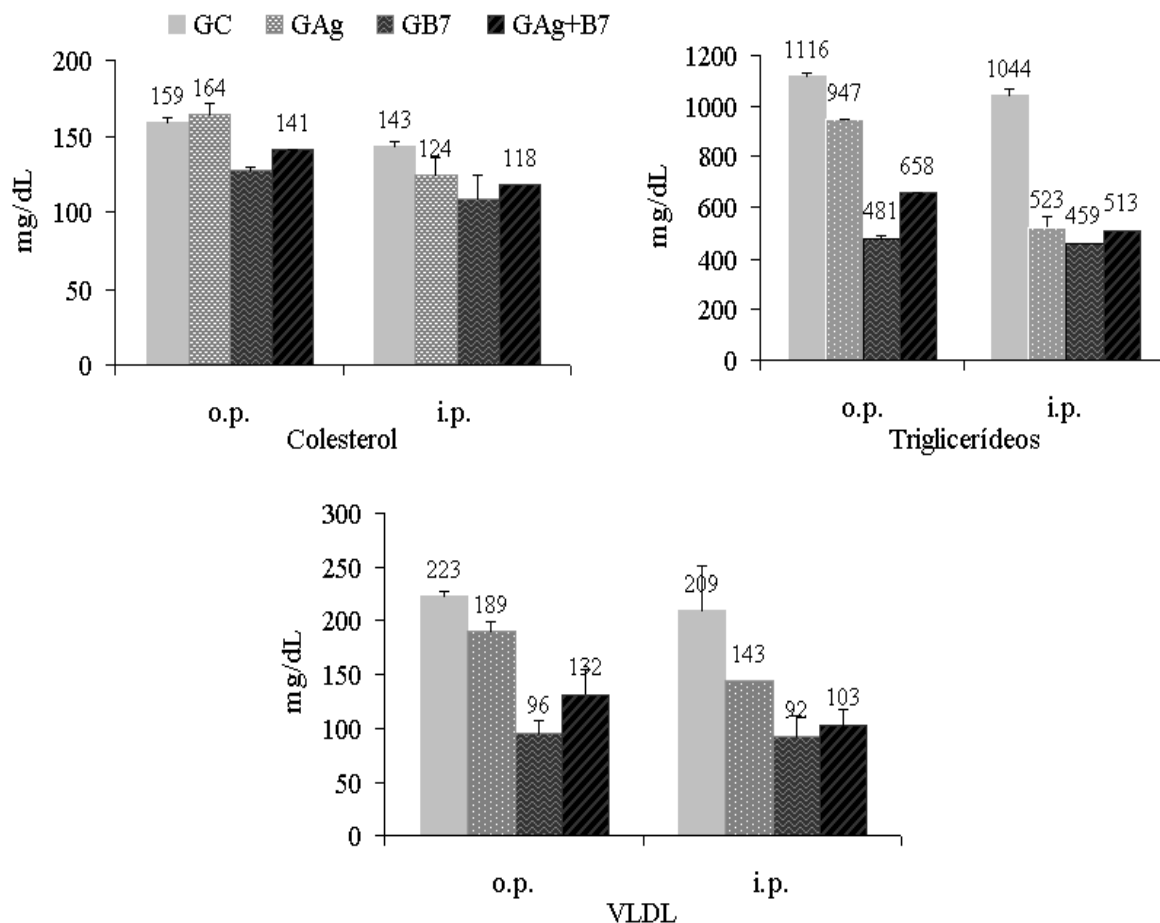


5.5.2.2.4 Influência da Administração de EPS Via Oral e Intraperitoneal Sobre o Metabolismo dos Lipídeos

Os dados obtidos para os valores de colesterol, triglicerídeos e VLDL das cobaias revelam que tanto a administração oral quanto a intraperitoneal nas concentrações utilizadas, durante uma semana, interferiu significativamente nos lipídeos. O grupo controle (GC) dos camundongos estudados revelam altos valores de colesterol e VLDL e hipertrigliceridemia comparados aos grupos que receberam EPS. Todos os grupos apresentaram redução nos valores dos parâmetros, porém, em concordância ao que foi visto no Exp.1, o grupo que recebeu EPS B7, mostrou-se mais eficaz com valores mais baixos para colesterol ($32 \pm 2,1 \text{ mg/dL}$ ($p < 0,005$) via *o.p.* e $44 \pm 10,5 \text{ mg/dL}$ ($p < 0,05$) via *i.p.*). O grupo GAg não apresentou diferença significativa comparado ao controle – com redução de $24 \pm 6 \text{ mg/dL}$ ($p > 0,05$) *o.p.* - . No grupo GAg+B7 a redução foi de $17 \pm 1,5$ ($p < 0,005$) via *o.p.* e $25 \pm 1,8$ ($p < 0,005$) via *i.p.* Quanto aos triacilglicerídeos houve redução de $164,5 \pm 5,6 \text{ mg/dL}$ ($p < 0,001$) para o grupo GAg, $635 \pm 8 \text{ mg/dL}$ ($p < 0,0002$) via *o.p.* e para o GB7 e $456,5 \pm 7$ ($p < 0,002$) para o GAg+B7, via *o.p.* A diferença de redução entre os grupos GB7 e GAg+B7 foi de $178,5 \pm 7 \text{ mg/dL}$ ($p < 0,01$). Quanto aos resultados dos valores de triglicerídeos para a via *i.p.* o grupo administrado com EPS de *A. brasilienses*, apresentou quedas mais expressivas: $528,5 \pm 24,7 \text{ mg/dL}$ *i.p.* e $164,5 \pm 5,6 \text{ mg/dL}$ ($p < 0,001$) *o.p.*

Pode-se afirmar que as doses de EPS administradas na condições oral e intraperitoneal tiveram praticamente o mesmo nível de redução. No entanto, o GAg apresentou redução maior via *i.p.* Os altos níveis de colesterol e frações podem estar relacionados ao estado comprometedora das cobaias frente ao Sarcoma 180. As maiores reduções foram observadas nos grupos administrados com EPS B7 pode ter sofrido influência do EPS da soja que correspondia a aproximadamente 75 % do EPS total utilizado neste grupo. Estudos clínicos que provam a relação do EPS de *Lactobacillus* e da arabinomanana proveniente da soja já foram citados nas revisões bibliográficas deste trabalho.

FIGURA 65 - INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE EPS VIA ORAL E INTRAPERITONEAL SOBRE O METABOLISMO DOS LIPÍDEOS



5.5.3 Inibição da Proliferação das Células do Sarcoma 180

A inibição da proliferação de células cancerígenas só foi observada no grupo administrado pela via intraperitoneal (*i.p.*) com EPS Ag. A tabela 66 mostra a média e a relação entre o volume de líquido ascítico dos testes via oral (*o.p.*) e intraperitoneal (*i.p.*) com seus respectivos controles. O número de células tumorais presentes na cavidade abdominal de cada grupo foram contadas após lavagem com PBS seguida de diluição.

Não houve diferenças significativas entre os grupos controle dos experimentos oral e intraperitoneal com os grupos Ag+B7 e B7 devido à alta variabilidade dos resultados obtidos. Quanto à inibição da proliferação celular nos grupos administrados

via oralmente o GAg apresentou redução de $44,32 \pm 7,4$ % no volume ascítico e de $36,1 \pm 4,1$ % no número de células. Para o grupo GAg+B7 não houve inibição no volume de líquido ascítico (aumento correspondente a $1,6 \pm 0,2$ %), mas houve redução no número de células tumorais de $22,2 \pm 5,7$ % comparada ao GC. Já grupo B7 $25 \pm 1,4$ % do volume ascítico e $15 \pm 2,8$ % no número de células tumorais foram reduzidos comparados ao GC.

Os grupos que receberam EPS via intraperitoneal apresentaram: inibição foi de $30,35 \pm 5,6$ % no volume de líquido ascítico e de $37,8 \pm 2,9$ % no número de células tumorais para o GAg; inibição de $13,9 \pm 1,5$ % do volume abdominal e apenas $2,6 \pm 0,5$ % do número de células tumorais para o GAg+B7 e, no grupo B7 a inibição do volume ascítico foi de $9,3 \pm 2,4$ % e houve aumento do número de células tumorais de $2,9 \pm 1,1$ % comparados ao controle.

TABELA 16 – VOLUME DO LÍQUIDO ASCÍTICO E NÚMERO DE CÉLULAS TUMORAIS NO PERITÔNIO EM EXPERIMENTO COM SARCOMA 180

GRUPOS	ORAL				INTRAPERITONEAL			
	GC	GAg	GAg+B7	GB7	GC	GAg	GAg+B7	GB7
VOLUME	9,6	5,34	9,75	7,2	5,6	3,9	4,82	5,08
Nº DE CÉLULAS $\times 10^6/\text{mL}$	45,7	29,2	35,62	38,8	30,7	19,1	29,9	31,6

Os resultados obtidos para atividade antitumoral do co-cultivo (*Agaricus brasiliensis* com *Lactobacillus paracasei*) mostraram-se menos eficaz contra células neoplásicas e ao processo inflamatório da cavidade abdominal que a atividade observada nos grupos alimentados apenas com o EPS do fungo *A. brasiliensis*. A bactéria láctica não apresentou atividade antitumoral nas cobaias.

Conclui-se que o tratamento via intraperitoneal na dose de 30mg/kg/dia foi mais eficaz que o tratamento via oral na dose de 300mg/kg/dia no período de uma semana, com uma média de redução do volume ascítico de $37,35 \pm 3,9$ % e do número de células de $34,8 \pm 3,5$ % para o grupo Ag. Os tratamentos realizados com os EPS do cultivo de

Ag+B7 não demonstraram eficácia na via oral, com aumento de $1,6 \pm 0,2$ % do volume ascítico e o grupo tratado com EPS do cultivo da bactéria láctica (B7) também não foi observado qualquer tipo de inibição comparado ao controle aumento de $2,9 \pm 1,1$ % do número de células tumorais.

Leifa *et al.* (2003) isolaram uma fração (EPS) solúvel em água, extraída do caldo de *Agaricus brasiliensis* e conduziram o experimento durante 10 dias, por via intraperitoneal em camundongos inoculados com Sarcoma 180. O EPS foi administrado na concentração de 10mg/Kg/dia, havendo redução de 72,19% da massa tumoral do tumor sólido, em relação ao grupo controle. Zhuang *et al.* (1993) realizaram, experimento durante 7 dias consecutivos com EPS extraído de *Pleurotus sajor-caju*, sobre S180 e registraram 100 % de inibição tumoral, porém os compostos e as glicanas presentes no extrato utilizado ainda não foi evidenciado. As investigações iniciais sobre as propriedades do *A. brasiliensis* foram realizadas contra a atividade antitumoral do Sarcoma 180. os melhores resultados foram apresentados por uma fração de cadeia simples de (1→6)-β-glicanopiransil (43,3%) e de proteínas (50,2%) com conteúdo elevado de leucina, alanina e baixas concentrações de metionina, histidina e tirosina (KAWAGUISHI *et al.*, 1990).

De modo similar aos demais cogumelos, a atividade antitumoral dos produtos isolados do *A. brasiliensis* é atribuída à sua atividade imunoestimulante, uma vez que a ação citotóxica direta não foi ainda relatada. Assim, produtos de *A. brasiliensis* têm a capacidade de estimular mecanismos imunológicos como a atividade fagocítica e macrófagos (o que explica os resultados obtidos sobre o aumento da atividade destas células neste trabalho apresentado pelos dados do GAg (ITO *et al.*, 1997), atividade de células Natura killer (NK) (GHONEUM, 1995, ITO *et al.*, 1997) e células T citotóxicas (EBINA *et al.*, 1998) de camundongos.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho concluiu-se que:

a) Produção de EPS de culturas isoladas e co-cultivo

- A produção do cultivo de *A. brasiliensis* foi alcançada com máxima concentração de 7,88 g/L de biomassa, no quinto dia e $1430,70 \pm 26,75$ de EPS no sexto dia, em meio contendo PSH a 29°C, 120 rpm.
- A bactéria B7 alcançou o melhor crescimento às 24 h, quando fermentada em meio com PSH, o que pode ser explicado pela facilidade de assimilação dos aminoácidos e peptídeo livres neste composto presente no meio de cultivo. Quanto à produção de EPS, pela bactéria foi de $80,2 \pm 6,9$ mg/L, embora após extração do caldo, a presença da PHS convertia este valor para 825 ± 91 mg/L. Novos meios de cultivo devem ser testados com a finalidade de otimizar a produção do EPS da bactéria láctica, visto que isto não foi possível neste experimento.
- O co-cultivo apresentou a máxima produção da biomassa do fungo de $8,14 \pm 0,03$ g/L e $4,99 \pm 0,1$ g/L para a B7 no décimo dia, porém a produção de EPS foi menor que o cultivo isolado (890 mg/L). Estudos que envolvam o co-cultivo fermentado em biorreatores com controle de pH e agitação poderiam otimizar a produção do EPS desta fermentação.
- Quanto ao tratamento prévio com TCA, os resultados indicam que houve redução na concentração de proteína presente no EPS extraído.

b) Caracterização Parcial dos EPSs

- O EPS de *A. brasiliensis* apresentou-se como uma galctomanana sem presença do EPS proveniente da PSH adicionada ao meio. É possível que o *A. brasiliensis* produza alfa-galactanases capazes de degradar as arabinanas ou arabinogalactanaos presentes no meio de cultivo pela adição das proteínas de soja hidrolisada, e por este motivo, o EPS da soja não foi encontrado no meio após fermentação do fungo.
- No EPS extraído do cultivo da B7 foi separado três frações em que, apenas uma, a Fração D, correspondia a um EPS complexo produzido pela bactéria láctica, cuja composição monossacarídica predominante foi de arabinana, galactana e xilose e

representou pouco mais de 10% do EPS total; porém ainda não caracterizado; as demais frações tinham origem da PSH, sugerindo tratar-se da mesma estrutura: $\beta(1\rightarrow4)$ Galp. Diferentemente do fungo *A. brasiliensis*, o *Lb paracasei* por não produzir a enzima alfa-galactanases, não pôde degradar as arabinogalactas, logo, elas estavam presentes em altas concentrações no EPS extraído deste fermentado.

- As informações obtidas por técnicas de RNM- ^{13}C sobre a Fr.A produzida pelo *Lb paracasei* representam um grande avanço em relação à estrutura química dos polissacarídeos produzidos por BAL, principalmente, porque poucos estudos foram publicados sobre a produção de EPS por esta bactéria e, até o momento ele apresenta estrutura diferente dos estudos já publicados.

- O co-cultivo apresentou EPS com estrutura e composição monossacarídica semelhante ao EPS produzido pelo *Ag brasiliensis*.

- Com exceção da Fr.A, os dados obtidos dos perfis cromatográficos mostraram que nenhuma fração apresentou-se homogênea. Portanto, é necessário que essas frações sejam submetidas a passos adicionais de purificação como, por exemplo, aumento da concentração de sal ou uma cromatografia de troca iônica, uma vez que a obtenção de polímeros homogêneos é importante para se propor uma estrutura química fina definida.

- Devido ao tempo não hábil para o estudo químico completo das estruturas presentes, não foi possível a purificação total dos biopolímeros e, conseqüentemente, a caracterização química fina dos mesmos. Entretanto, a elucidação das estruturas desses polissacarídeos é possível de ser realizada em estudos futuros. Logo, novos experimentos envolvendo uma caracterização mais aprofundada deverão ser feitos a fim de esclarecer a estrutura macro-morfológica dos exopolissacarídeos.

- A microscopia foi útil para visualizar e analisar as estruturas micromorfológica e monométrica dos EPSs, que se apresentaram morfo-estruturalmente diferentes. A imagem do EPS Ag+B7 apresentou duas estruturas diferentes, aparentemente, provenientes do cultivo do fungo e outro da BAL. Entretanto, a caracterização parcial do EPS do co-cultivo revela apenas a presença de um EPS semelhante ao EPS de *A*.

brasiliensis. Logo, estas imagens devem ser repetidas por MEV até que se chegue a uma conclusão.

c) Efeito biológico do EPS

- Os valores dos testes plasmáticos para avaliar a redução no nível de glicose realizada com as cobaias suplementadas com 30 mg/kg/d de EPS apresentaram baixas de 22,1% para o GAg, 47,6% para o GB7 e 45,1% para o grupo Ag+B7, revelando melhores resultados que a alimentação de 300 mg/kg/d durante uma semana, cujas baixas foram de: 5,5% para o GAg, 8,9% para o GB7 e 14,5% para GAg+B7, comparados ao grupo controle. Os valores de glicose foram menores nos grupos B7 e Ag+B7. Os valores sorológicos para avaliar a redução de colesterol também foram melhor após alimentação em longo prazo para todos os grupos: 26,1% (Gg), 24% (GB7) e 22,1% (GAg+B7) comparados aos respectivos valores: 3,1% (GAg), 22,6% (GB7) e 14,1% (GAg+B7) durante a suplementação por apenas uma semana.
- Já adosagem intraperitoneal na concentraçãod e 30 mg/kg/d foi mais eficaz que a dosagem de 300mg/kg/d, durante uma semana, tanto para a redução da glicose: redução de 13,4% (GB7) e 22,4% (GAg+B7) via *i.p.* e 5,5% (GAg), 8,9% (GB7), 14,5% (GAg+B7) via *o.p.*, quanto para colesterol: 24,5% (GB7), 23,1% (GAg+B7) via *i.p.* e 3,1% (GAg), 22,6 (GB7), 14,1% (GAg+B7) via *o.p.*. Novamente, os grupos B7 e Ag+B7 tiveram reduções maiores comparados ao grupo controles. Talvez por influência da presença do EPS da PSH, necessitando de um estudo isolado deste EPS para verificar seu potencial.
- não houve danos aparentes para os rins, fígado e metabolismo das proteínas das cobaias em qualquer experimento.
- Os testes feitos para avaliar a ativação macrofágica revelaram aumentos consideráveis na adesão, atividade fagocítica, produção de ânion superóxido, lisossomos pelos macrófagos do grupo alimentado com EPS Ag comparado ao grupo controle e aos alimentados com EPS da bactéria láctica e do co-cultivo.

- Os estudos realizados para verificar efeito anti-tumoral mostrou maior nível de inibição no grupo Ag pelo tratamento intraperitoneal na dose de 30mg/kg/dia, com média de redução de volume ascítico de $37,35 \pm 3,9$ % e do nº células de $34,8 \pm 3,5$ %.

REFERÊNCIAS

- AGRAHAR-MURUGKAR, D.; SUBBULAKSHMI, G. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. **Food Chemistry**, 89, 599-603, 2005.
- AHMAD, N.; MARTH, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 degree in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. **J. Food Prot.**, 52, 688-695, 1989.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular e celular**. 3º ed., Artmed, Porto Alegre, 1997.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- AMARAL, A. E.; CARBONERO, E. R.; SIMÃO, R. C. G.; KADOWAKI, M. K.; SASSAKI, G. L.; OSAKU, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An unusual watersoluble b-glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers** doi:10.1016/j.carbpol.2007.09.016.
- ANKE, T. **Fungal Biotechnology**. London: Chapman and Hall, 1997.
- ARAÚJO, N. Q. **Produção de Biomassa Fúngica de Vinhoto**. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 1976.
- ARDAWI, M. S. M.; NEWSHOLME, E. A. A glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **J. Biochem.**, 212, 835-842, 1993.
- ATTA, A. M.; MAGALHAES, L. A.; RANGEL, H. A. Schistosomiasis mansoni: II - evolution of the levels of serum proteins and of their electrophoretic pattern as traced by quantitative immunoelectrophoresis. **Rev. Saúde Pública**, 15, 2, 194-204, 1981.
- AUGER, M. J.; ROSS, J. A.; The biology of macrophage. In: Lewis, C. E.; Mmgee, O.; Berger, A.; German, J. B.; Chiang, B. L.; Ansari, A. A.; Keen, C. L.; Fletcher, M. P.; Gershwin, M. R. **The natural immune system: The macrophage**. Oxford: IRL Press, 1-74, 1994.
- van den BERG, D.J.C.; ROBIJN, G.W.; JANSSEN, A.C.; GIUSEPPIN, M.L.F. *et al.* Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. **Appl. and Environ. Microbiol.**, 61, 2840-2844, 1995.

BARBER, M. D. Cancer cachexia treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, 17, 751-755, 2001.

BATTCOCK, M.; AZAM-ALI, S. Fermented fruits and vegetables. A global perspective. **FAO Agricultural Services Bulletin**, n.134, 1998. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Consulta em: 21 nov>, 2005.

BENTHIN, S.; VILLADSEN, J. Different inhibition of *Lactobacillus elbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. **J. Appl. Bacteriol.**, 78, 647-654, 1995.

BERTOLINI, M. L. C; CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polisaccharides isolated from soybean flour. In: **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**, ResumoID:8590, 2006.

BESSEY, P. Q.; WATTERS, J. M.; AOKI, T. T.; WILMORE, D. W. Combined hormonal infusion simulates the metabolic response to injury. *Ann. Surg.*, 200, 264-282, 1984.

BIFFI, A.; CORADINI, D.; LARSEN, R.; RIVA, L.; DI FRONZO, G. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. **Nutr. Cancer**, 28, 93–99, 1997.

Bioquímica Anterior <www.med.unne.edu.ar/.../bioquimicaanterior/inter.htm>. Acesso em fevereiro de 2008.

BIOMERIEUX. Apiweb. Api 50 CHL V5.1. Disponível em: <<http://apiweb.biomerieux.com>> Consulta em: 11 out., 2007.

BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO. Pesquisa. Extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica β -glucanas do cogumelo *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann = *Agaricus brasiliensis* Wasser asser asser, Diduck, de Amazonas & Stamets): Extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica, 35, 36-47, 2007.

BONATTO, S. J. R. **Avaliação da resposta imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Departamento de Biologia Celular e Molecular, setor Ciências biológicas, Universidade federal do Paraná. 20-40p, 2003.

BRUM, A. A. **Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos**.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 117p, 2005.

BYCZKOWSKI, J., GESSNER, T. Biological role of superoxide ion-radical. **Int. J. Biochem.**, 20, 569-580, 1988.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GODMAN; GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S. Goodman e Gilman – **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 96-124, 1998.

CALDER, P. C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr. Rev.**, 56, S70-S83, 1998.

CERNING, J. In: ROISSANT, H. e LUQUEST, F. M. **Bactéries Lactiques, Aspects Fondamentaux et Technologiques**, Ed Lórica, 1, 309-310, 1994.

CARBONERO, E. R. Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes fotobiontes. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 120p, 2005.

CERSOSIMO, E.; PISTERS, P. W. T.; PESOLA, G.; MCDERMOTT, K.; BAJORUNAS, D.; BRENNAN, M. F. Insulin secretion and action in patients with pancreatic cancer. *Câncer*, 67, 486-493, 1991.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*. **Carbohydr. Res.**, 339, 2249-2254, 2004.

CHAMPAGNE, C.P.; GAUDRAULT, H. and CONWAY, J. Effect of ultrafiltration of baker's and brewer's yeast extracts on their nitrogen content and turbidity. *Acta Alimentaria*, 28,4, 321-328, 1999.

CHANG, S. T. The development of the mushroom industry in China, with a note on possibilities for Africa. **Acta Edulis Fungi**, 12, 3-19, 2005.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; CHAVANT, L. A water-soluble b-D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, 43, 2, 413-415, 1996.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus code protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, 4, 403-409, 2004.

CHIN-H S, KO-J L, BOR-JIUN W. Effects of culture pH on the production of bioactive polysaccharides by *Agaricus blazei* in batch cultures. **Journal of Chemical and biotechnology**, 79, 998-1002, 2004.

CHOI, S.S.; KIM, Y.; HAN, K.S.; YOU, S.; OH, S.; KIM, S.H. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, 42, 452–458, 2006.

CICLO DE VIDA DE UM BASIDIOMICETO
<www.biology.lsu.edu/.../lifecycle.html>. Acesso em fevereiro de 2008.

CLEARY, J. A.; GRAHAM, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. **Immunology and Cell Biology**, 77, 395-403, 1999.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbial Reviews**., 46, 269-280, 1987.

CORDS, B.R.; DYCHDALA, G.R. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides. In: **Antimicrobials in Foods**, 2nd edition. eds. DAVIDSON, P.M; BRANEN, A.L., **Marcel Dekker Inc.**, 469-537, 1993.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.-J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; Dasgupta, M.; Marrie, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, 41, 435-464, 1987.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 34, 4, 245-253, 2002.

CUESTA, G; SUAREZ, N; BESSIO, M. I; FERREIRA, F; MASSALDI, H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using modification of phenol-sulfuric acid method. **Journal Microiological Methods**, 52, 69-73, 2002.

CUI, F. J. ; TAO, W. Y.; XU, Z. H. ; GUO, W. J. ; XU, H. Y.; AO, Z. H.; JIN, J.; WEI, Y. Q. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. **Bioresource Technology**., 2006.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole, São Paulo, 2002.

ÇAGLARIRMAK, N. The nutrients of the exotic mushroom (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. **Food Chemistry**, 105, 1188-1194, 2007.

DAVIDSON, P.M.; POST, L.S.; BRANER, A.L.; MCCURDY, A.R. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: **Antimicrobials in Foods**. eds. DAVIDSON, P. M. e BRANEN, A. L. Marcel Dekker Inc., 385-392, 1983.

DELLAGLIO, F.; DE ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M. C.; JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: DE ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries Lactiques – Aspects fondamentaux et technologiques**. Ed. Lórica, 1, 25-116, 1994.

DELMANTO, R.; LIMA, P.; SUGUI, M.; EIRA, A.; SALVADORI, D.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, 496, 15-21, 2001.

DE ROOS N.M.; KATAN M.B. Effects of probiotics bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **Am. J. Clin. Nutr.**, 71, 405–411, 2000.

De VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria FEMS. **Microbiology Reviews**. 23, 153-177, 1999.

DEWYS, W. D.; BEEG, C.; LAVIN, *et al.* Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. **Am. J. Med.**, 69, 491-597, 1980.

DI LUZIO, N. R; WILLIAMS, D. L. Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mic. **Infec Immun.**, 20, 804, 1978.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.; FANG, J. Structural characterization of water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydr. Res.**, 337, 1417–1421, 2002.

DUNLOP, R. J.; CAMPBELL, C. W. Citokines and advanced cancer. **J. Pain and Symptom Management**, 20, 214-232, 2000.

EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, 11, 259-265, 1998.

EGUCHI, F.; WATANABE, Y.; ZHANG, J.; MIYAMOTO, K.; YOSHIMOTO, H.; FUKUHARA, T.; HIGAKI, M. Inhibitory effects of hot water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Traditional Medicines**, 16, 201–207, 1999.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FAN L. **Production of extra-cellular polyssacharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state fermentation and its antitumor effect**. Doctor tesis, Department Biotechnology Process, University Federal of Paraná, 30-50p, 2002.

FAN, L.; SOCCOL, A.T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A.; SOCCOL, C.R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.* LPB 03 (Agaromycetidae) in submerged fermentation and its antitumor effect. **International Journal of Medicinal Mushroom**, 5, 17-23, 2003.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report**. Cordoba – Argentina, 2001.

FARBER, J.M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology – a review. **J. Food Prot.**, 54, 58-70, 1991.

FELIPPE, J. Jr. *et al.* Prevenção da infecção hospitalar em politraumatizados com o emprego de imunomodulador: glucana. Anais do IV **Congresso Brasileiro de Medicina Intensiva**, 1988.

FELIPPE, J. Jr; Rocha e Silva, M. Jr., *et al.* Infection prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator β -1,3 polyglucose-glucan. **Surgery, Genecology and Obstretics**, 177, 383-388, 1993.

FERNANDES, L. C.; CARPINELLI, A. R.; HELL, N. S. ; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Ther. Control**, 1, 259-268, 1991.

FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **A.J.P.**, 258, 1033-1036, 1990.

FERRARI, R.A.; DEMIATE, I.M. Soybean isoflavones – a shot review. **Biological and Health Sciences**, 7, 1, 39-46, 2001.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmac-Toxicological Problems. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 5, 1, 3-15, 2007.

FORSÉN, R.; HEISKA, E.; HERVA, E.; ARVILOMMI, H. Immunobiological effects of *Streptococcus cremoris* from cultured milk 'viili'; application of human lymphocyte culture techniques. **Int. J. Food Microbiol.**, 5, 41-47, 1987.

FRAGA, M.; SCAVONE, P.; PABLO, Z. Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. **Antonie van Leeuwenhoek**, 88, 25–34, 2005.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity in radical explanation. **J. Exp. Biol.**, 201, 1203-1209, 2000.

FUJIMIYA, Y.; YAMAMOTO, H.; NOJI, M.; SUZUKI, I. Peroral Effects on Tumor Progression of Soluble B-(1,6)-Glucans Prepared by Acid treatment from *Agaricus blazei* Murr.(Agaricaceae, Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms.**, 2, 2, 2000.

FUJIMIYA, Y; SUZUKI, Y; KATAKURA, R; EBINA, T. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. **Anticancer Res.**, 1A, 19, 113-8, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, 66, 365–378, 1989.

GAO, Y.; LAN, J.; DAI, X.; YE, J. ZHOU, S. A phase I/II study of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) Extract in patients with type II diabetes mellitus. **Int. J. Med. Mushrooms**, 6, 1, 2004.

GAW, A.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.J.; STEWART, M.J; SHEPHERD, J. **Bioquímica Clínica**, 2ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 55-65, 2001.

GENNARI, J. L. Cogumelos medicinais como prevenção e tratamento de enfermidades In: **III Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, II Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis**, ANAIS, Embrapa, São Paulo, 98-99p, 2006.

GERN, J. C. **Production and characterization of extra-cellular polysaccharide from submerged fermentation by *Agaricus brasiliensis***. Master Thesis, Department Biotechnology Process, University Federal of Paraná. 34p, 2005.

GHONEUM, M. Royal Agaricus mushroom enhances murine natural killer cell activity *in vivo*, **9th International congress of Immunology**, USA, Abstract book, nº 2890, 1995.

GÓMEZ, E.; MELGAR, M.M.; PÉREZ SILVA, G.; PORTOLÉS, A.; GIL, I. Exocellular products from *Bifidobacterium adolescentis* as immunomodifiers in the

lymphoproliferative responses of mouse splenocytes. **FEMS Microbiol. Lett.**, 56, 47-52, 1988.

GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.M.P.S.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydr. Polymers**, 60, 43-49, 2005.

GRUTER, M.; LEEFLANG, B.R.; KUIPER, J.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.G. Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. **Carbohydr. Res.**, 231, 273-291, 1992.

GUIMARÃES, G. C.; OLIVEIRA, T.; AIBARA, E. H.; LOPES, A; MONTAGNINI, A. L. Nutrição e Câncer. **Acta Oncol. Brás.**, 22, 227-232, 2002.

GU, K.; COWIE, C.C.; HARRIS, M.L. Diabetes and decline in heart disease mortality in U.S. adults. **JAMA**, 281, 1291-1297, 1999.

GUTERREZ, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in vitro**, 18, 301-309, 2004.

GUTIERREZ-ROJAS, M.; HUERTA-OCHOA, S.; ULIBARRI, R. L.; CASTANEDA, G. S.; TORREZ, E. F.; GONZALEZ, G. V. **Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-Industrial Raw Materials**. França: L'Imprieme ARTI à Nimes, 143p, 1992.

GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**, 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 299-306p, 1988.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, 44, 331-384, 1980.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.) **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2, 19-54, 1995.

HATCHER, G. E.; LAMBRECHT, R. S. Augmentation of Macrophage Phagocytic Activity by Cell-free Extracts of Selected Lactic Acid-producing Bacteria, **Journal of Dairy Science**, 76, 2485-2493, 1993.

HITOSHI, K.; SATOSHI, I.; KENJI, O.; YOSHIHITO, A.; TAKASHI, T. Hypotensive Effects and Safety of Extracts Squeezed from *Agaricus blazei* on High-normal Blood Pressure and Mild Hypertensive Subjects. **Japanese Pharmacology & Therapeutics**, 34, 12, 1323-1341, 2006.

HINZ, S.W.A.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; VINCKEN, J-P.; VORAGEN, A.G.J. Type I arabinogalactan contains β -d-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -d-Galp structural elements. **Carbohydrate Research**, 340, 13, 2135-2143, 2005.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS, **Microbiology Reviews**, 29, 815-835, 2004.

HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. **J. Dairy Sci.**, 82, 690-695, 1999.

HSIEH, C.; LIU, C-J.; TSENG, M.H.; LO, C-T.; YANG, Y-C. Effect of olive oil on the production of micelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under hight oxygen concentration aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

HSU, J-T.; JEAN, M-A.; YING, C. Differential display screening for specific gene expression induced by dietary nonesteroidal estrogen. **Mol. Production and Development**, 55, 2, 141-148, 1999.

HUANG, S. J.; HUANG, L. C.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. <http://www.mushworld.com> Acesso em: 26 de março de 2006.

Instituto Nacional de Câncer (INCA) Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Rio De Janeiro, 38 p., 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – Diabetes Atlas <www.eatlas.idf.org> Acesso em janeiro de 2008.

INUI, A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management. **CA Cancer J. Clin .**, 52, 72-91, 2002.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Research**, 17, 277-284, 1997.

JAHREIS, G.; VOGELSANG, H.; KIESSLING, G.; SCHUBERT, R.; BUNTE, C.; HAMMES, W. P. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers = Influence d'une saucisse probiotique (*Lactobacillus paracasei*) sur les lipides sanguins et les paramètres immunologiques chez des volontaires en bonne santé. **Food research international**, 35, 113-138, 2002.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2006. **CA Cancer J Clin.**, 56, 106-130, 2006.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M.J. Cancer Statistics, 2007. **CA Cancer J. Clin.**, 57, 43–66, 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 50p, 2000.

JENNEMAN R, BAUER BL, BERTALANFFY H, SELMER T, WIEGANDT H. Basidiolipids from *Agaricus* are novel immune adjuvant. *Immunobiology*, 200, 2, 277-289, 1999.

JONATHAN, S.G.; FASIDI, I.O. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* and *Schizophyllum commune* from Nigeria. **Food Chemistry**, 75, 303-307, 2001.

KAILASAPATHY K. e CHIN J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.*, 78, 80–88, 2000.

KANNEL, W.B.; HJORTLAND, M.; CASTELLI, W.P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. **Am. J. Cardiol.**, 34, 29-34, 1974.

KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiol. Rev.**, 46, 233-244, 1987.

KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F.K.; MØLLER, P.L.; ARDÖ, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, 36, 1037–1046, 2003.

KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **Int. J. Immunopharmacol.**, 16, 29–36, 1994.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. **Microbiology and Immunology**, 27, 7, 611-618, 1983.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 26, 3, 215-221, 1988.

KAWAGOE, M.; NAGAOKA, Y.; ARAKI, N.; YAMAGAMI, K.; NAOE, K.; NODA, H. Submerged culture of *Agaricus blazei* mycelium in a bubble column fermentor. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 37, 8, 1056-1061, 2004.

KAWAGUISHI, H; KANAO, T.; INAGAKI, R *et al.* Formolysis of *A. blazei* murill fruiting bodies and antitumor activity of resulting products. **Carbohydr. Polymers**, 12, 393-403, 1990.

KIM, H.H, JEONG-GEL, N., CHANG, Y.K., CHUN, G.T., LEE, S.J., JEONG, Y.H. Optimization of Submerged Culture Conditions for Mycelial Growth and Exopolysaccharides Production by *Agaricus blazei*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**., p. 944-951, 2004.

KIM, H.H; JEONG-GEL, N.; CHANG, Y.K.; CHUN, G.T.; LEE, S.J.; JEONG, Y.H. Effects of Dissolved Oxygen Control on Cell growy and EPS production in Batch Culture of *Agaricus blazei*. **Korean Journal Chemical Engineering**., 2, 80-84, 2005.

KIMMEL, S.A.; ROBERTS, R.F.; ZIEGLER, G.R. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium . **Applied and Environmental Microbiology**., 64, 659 664, 1998.

KIM, S.W.; HWANG, H.J.; XU, C.P.; NA, Y.S.; SONG, S.K.; YUN, J.W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, 389-393, 2002.

KITAZAWA, H.; YAMAGUCHI, T.; ITOH, T. B-cell mitogenic activity of slime produced from slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. **J. Dairy Sci.**, 75, 2946-2951, 1992.

KNAPP, M. L.; AL-SHEIBANI, S.; RICHES, P. G.; HANHAM, I. W. F.; PHILIPS, R. H. Hormonal factors associated with weight loss in patients with advanced breast cancer. **Ann. Clin. Bioch.**, 28, 480-486, 1991.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E. ; SCHERPHOF, G. L ; DAEMEN, T. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Oncology Hematol.**, 44, 143-161, 2002.

KONG, S.; DAVISON, A. J. The role of interactions between O_2 , H_2 , OH^\cdot and O_2^\cdot in free radical damage to biological systems. **Arch. Biochem. Biophys.**, 204, 13-29, 1980.

LACAZ, C. S.; BLÜCHER, E. **Antibióticos**. Ed. Universidade de São Paulo, 1-67p, 1975.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**., 19, 597-625, 2001.

LAW, M. R.; WALD, N. J.; THOMPSON, S. G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? **BMJ**, 308, 367-372, 1994.

LeBLANC, A. M.; MATAR, C.; LeBLANC, N.; PERDIGÓN, G. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. **Breast Cancer Research**, 7, R477-R486, 2005.

LEE, J.W.; SHIN, J.G.; KIM, E.H.; KANG, H.E.; YIM, I.B.; KIM, J.Y.; JOO, H.G.; WOO, H.J. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. **J. Vet. Sci.**, 5, 41-48, 2004.

LEEK, R. D.; LEWIS, C. E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; HARRIS, A. L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res.**, 56, 4525-1996, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, L. F. O.; COSTA, G. N. O.; RIBEIRO, A. A.; NEVES, J. T. M. Avaliação da presença de compostos secundários com atividade antimicrobiana no fungo *Crinipellis pernicioso*. **10º Seminário de Iniciação Científica. Livro de Resumos**, Ed. Editus UESC, Ilhéus, 123-124p, 2004.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. The pharmacological potential of mushrooms. **Journal and Oxford University Press.**, 2, 3, 285-299, 2005.

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev.**, 87, 149-164, 1990.

LIN, J.; YANG, S. Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murill by submerged fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection.**, 39, 98-108, 2006.

LOOIJESTEIJN; P. J.; BOELS, I.; KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* by the sugar source. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 5003-5008, 1999.

LOPES, S. **Bio**. São Paulo: Editora Saraiva, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1951.

LUIZ, R. C.; JORDÃO, B. Q.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Mechanism of anticlatogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mutation Research**, 528, 75-79, 2003.

MDACHI, S. J. M.; NKUNYA, M. H. H.; NYIGO, V. A.; URASA, I. T. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. **Food Chemistry**, 86, 179-182, 2004.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, 65, 477-482, 1999.

MARASCHIN, M. **Variação somaclonal, metabolismo de carbono e caracterização bioquímica e imunológica nos cultivos celulares de *Mandevilla velutina* (MART) WOODSON (*Apocynaceae*)**. Curitiba. Tese M. D., Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 60p, 1998.

MATSUI, T. O.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 26, 133-144, 2003.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunol. Cell Biol.**, 78, 67-73, 2000.

MIETTINEN, M.; VUOPIO-VARKILA, J.; VARKILA, K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. **Infect. Immun.**, 64, 12, 5403-5405, 1996.

MISSINA, M.J. Legumes and soybean: an their nutritional profiles and health effects. **American J. of Clinical Nutrition**, 70, 3, 439-4505, 1991.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid cultured *Agaricus blazei* Mill. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 47, 4, 707-714, 1999.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, v54, 11, 2889-2896, 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of waterinsoluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural Biological Chemistry**, 54, 11, 2897-2905, 1990b.

MONTVILLE, T.H.; COONEY, C.L.; SINSKEY, A.J. *Streptococcus mutans* dextranucrase: a review. *Adv. Appl. Microbiol.* 24, 55-84, 1978.

MORETTI, E. P Crescimento Populacional. **Microbiologia, Saúde e Ambiente - Seção 1 Bacteriologia**, 2007.

MOROTOMI, M. Properties of *Lactobacillus casei* Shirota Strain as Probiotics' in Asia Patients. **Journal of Clinical Nutrition**, 5, 29-30, 1996..

NAKAJIMA, H.,; TOYODA, S.; TOBA, T.; ITOH, T.; MUKAI, T.; KITAZAWA, H.; ADACHI, S. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495. **J. Dairy Sci.**, 73, 1472-1477, 1990.

NAKAMURA, Y. Studies on Anti-Hypertensive Peptides in Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. **Bioscience Microflora**, 23, 4, 131-138, 2004.

NAKASONE, K. K., PETERSON, S. W., JONG, S-C. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. In: MULLER, G. M., BILLS, G. F. e FOSTER, M. S. **Biodiversity of Fungy**. Ed. Elsevier Academic Press. California, USA, 2004.

NEITENBERG, G.; RAYNARD, B. Nutritional support of the câncer patient: issues and dilemmas. **Critical Reviews in oncology/Hematology**, 34, 137-168, 2000.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, 153, 375-380, 1944.

NIE, X.; SHI, B.; DING, Y.; TAO, W. Preparation of chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2006.

NOÇÕES GERAIS SOBRE O DIABETES **Fonte: Roche - Divisão Diagnostics para Pacientes e profissionais de Saúde**, <<http://www.diabetesbrasil.com>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2008.

ODA, M., HASEGAWA, H., KOMATSU, S., KAMBE, M., TSUCHIYA, F. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. **Agric. Biol. Chem.**, 47, 1623-1625, 1983.

OHNO, N.; HAYASHI, M.; IINO, K.; SUZUKI, I.; OIKAWA, S.; SATO, K.; YADOMAE, T. Effect of glucans on the antitumor activity of Grifolan. **Chem. Pharm. Bull.**, 34, 2149-2154, 1986.

OVESON, L.; HANNIBAL, J.; MORTENSEN, E. L. The interrelationship of weight loss, dietary intake, and quality of life in ambulatory patients with cancer of the lung, breast and ovary. **Nutrition and Cancer**, 19, 159-167, 1993.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 82, 279-289, 2002.

PATOLOGIA CLÍNICA **Manual Rhesus de Patologia Clínica**, Análises Clínicas, Citologia e Anatomia Patológica, 9ª edição, Rh Rhesus, São Paulo-SP, 327-641p, 2002.

PENGA, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; XUA, Y. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. **Carbohydrate Polymer**, 54, 297-303, 2003.

PERDIGÓN G.; MACIAS, M. E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; RUIZ HOLGADO, A. A. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infect. Immun.**, 53, 404-410, 1986..

PRADO, F. C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de Água de coco Tese Doutorado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 2007.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.

RAFTER, J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. **British Journal of Nutrition**, 88, S89-S94, 2002.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 17, 5, 849-859, 2003.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: Editora Universitária – UFPel., 1, 344, 1996.

REID G. The scientific basis for Probiotic strains of *Lactobacillus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65, 3763-3766, 1999.

RICHARDS, R.M.E.; XING, D.K.L.; KING, T.P. Activity of *p*-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, 78, 209-215, 1995.

[ROBIJN, G. W.](#); [WIENK, H. L.](#); [van DEN BERG, D. J.](#); [HAAS, H.](#); [KAMERLING, J. P.](#); [VLEIGENTHART, J. F.](#) Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei*, **Carbohydr Res.**, 285, 14, 129-39, 1996.

ROESSING, A. C. **Situação Mundial das Oleaginosas**. Informe Econômico, CNPSo, 2, 9-10, 2005.

ROIT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE. *Imunologia*, 3^a ed. São Paulo; manole, 1994.
ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Ann Allergy Asthma Immunology**, 1, 85, 9-18, 1992.

ROLFE, R. D. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, 130, 396S–402S, 2000.

ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 79, 1/2, 3-16, 2002.

RUAS-MADIEDO, R.; REYES-GAVILÁN, C. G. *Invited Review*: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, **American Dairy Science Association**, 88, 843–856, 2005.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. Curitiba, Tese M. D. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 168 p, 2006.

SAKAMOTO, T.; THIBAUT, J. F. Exo-Arabinanase of *Penicillium chrysogenum* Able To Release Arabinobiose from α -1,5-L-Arabinan. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67, 7, [3319–3321](#), 2001.

SALES, A. M.; SALVA, T. J. G.; MENEZES, T. J. B. Incorporação de Biomassa Fúngica em Resíduos Agroindustriais por fermentação Submersa. **Coletânea ITAL.**, 17, 2, 141-146, 1988.

SAXELIN, M. **Development of dietary probiotics: estimation of optimal *Lactobacillus* GG concentrations**. Ph.D. Thesis, University of Turku, Finland, 1995.

SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.) **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2, 7-18, 1995.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, 67, 2189-2196, 2006.

SHEER, C. J. Regulation of molecular phagocyte proliferation by colony factor-1. **Int. J. Cell Cloning**, 8, 1, 46-62, 1990.

SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7. **Biotechnology letters**, 25, 2061-2064, 2003.

SAITO, H.; OHKI, T.; YOSHIOKA, Y.; FUKUOKA, F. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study of a gel-forming branched (1,3)- β -D-glucan from *Pleurotus ostreatus* (fr.): determination of side-chains and conformation of the polymer-chain in relation to gel- structure. **FEBS Lett.**, 68, 15–18, 1976.

SOCOL, C. R.; PANDEY, A. Bioconversion of agroindustrial residues for bioprocesses. Cassava industry residues. **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**, 3, 2, 443-452, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES –SBD-, **Diabetes no Brasil**. <<http://www.diabetes2007.com.br/imprensa/apoio1.php>>. Acesso em 10 de dezembro de 2007.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA Y. *et al.* Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus bazei* Murrill fractions in vitro. **Cell Struct. Funct.**, 26, 103-108, 2003.

STAMETS, P. Mycomedicinals: an informational booklet on medicinal mushrooms. Cross-Index of **Mushrooms and targeted disease complexes**, 4p, 1997.

STIJVE, T.; AMAZONAS, M. A. A.; GILLER, V. Flavour and taste components of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem. A new gourmet and medicinal mushroom. **Dtsch Lebensm.-Rundsch.**, 98, 448-453, 2002.

STINGELE, F.; NEESER, J.-R.; MOLLET, B. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. **J. Bacteriol.**, 178, 1680-1690, 1996.

SUNDERKOTTER, C.; STEINBRINK, K.; GOEBELER, M.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Macrophages and angiogenesis. **J. Leukoc Biol.**, 55, 410-420, 1994.

TABUCHI, M.; MORITA, H.; HE F.; HOSODA, M.; YAMADA, N.; ISHIDA, T. Effect of administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG on postprandial blood glucose levels in rats. **Milk Science**, 54, 1, 17-21, 2005.

TAKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; SATO, M.; NOMOTO, K.; MOROTOMI, M.; YOKOKURA, T. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. **Carcinogenesis**, 22, 599–605, 2001.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumoral compound *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **J. Nutr.**, 131, 1409-1413, 2001.

TAKESHI, T.; YOSHIYUKI, K.; HIROMICHI, O. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murrill and its Mechanism of Action. **J. Nutr.**, 131, 1409-1413, 2001.

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. **Nature**, 2, 862-871, 2002.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrition**, 13, 1-7, 1997.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, 17, 438-442, 2001.

TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; HAYASHI, N.; FURUKAWA, K.; NAKAJIMA, N. n-3 Versus n-6 polyunsaturated fatty acids in critical illness. **Nutrition**, 14, 551-553, 1989.

TOSHIRO, W.; AYAKO, K.; SATOSHI, I.; KUMAR, M.T.; SHIRO, N.; KEISUKE T. Antihypertensive effect of gamma-aminobutyric acid-enriched *Agaricus blazei* on mild hypertensive human subjects. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, 50, 167-173, 2003.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, 165, 444, 1950.

VANINGELGEM F.; ZAMFIR M.; ADRIANY, T.; DE VUYST, L. Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 6, 1257-1273, 2004.

VANINGELGEM, F.; ZAMFIR, M.; MOZZI, F.; ADRIANY, T.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; DE VUYST, L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 2, 900-912, 2004b.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. An Evaluation of the Immunological Activities of Commercially Available β -(1, 3)-Glucans. **Jana**, 10, 1, 25, 2007.

WAGNER, M. K.; MOBERG, L. J. Present and future use of traditional antimicrobials. **Food Technol.**, 1, 143-147, 1989.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun

Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 4, 297-90, 2002b.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 60, 258-274, 2002a.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical ReviewsTM in Immunology**, 19, 65-96, 1999a.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1, 31-62, 1999b.

WATANABE, T.; KAWASHITA, A.; ISHI, S.; MAZUMDER, T. K.; NAGAI, S.; TSUJI, K.; DAN, T. Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid-enriched *Agaricus blazei* on mild hypertensive human subjects. **J. Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**. (Abstract), 50, 167-173, 2003.

WATANABE, T.; YAMADA, T.; TAMAKA, H.; JIANG, S.; MAZUMDER, T. K.; NAGAI, S.; TSUJI, K. Antihypertensive effect of gamma-aminobutyric acid-enriched *Agaricus blazei* on spontaneously hypertensive rats. **J. Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**. (Abstract), 49, 166-173, 2002.

WATTERS, J. M.; BASSEY, P.Q.; DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M.; WILMORE, D. W. Both inflammatory and endocrine mediators stimulate host responses to sepsis. **Arch. Surg.**, 121, 129-190, 1986.

WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trend in Biotechnology**, 21, 269–274, 2003.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, 2, 65-68, 1963.

WONG, H-C.; CHEN, Y-L. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54, 2179-2184, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION <www.who.int>. Acesso em Janeiro de 2008.

YANAKI T, ITO W, TABATA K, *et al.* Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. **Biophys Chem.**, v. 17, p. 337-342, 1983.

YANG, B. Y.; GRAY, J. S. S.; MONTGOMERY, R. Extracellular polysaccharide of *Erwinia chrysanthemi* CU643. **Carbohydrate Research**, 316, 138-154, 1999.

YANG, F.C.; LIAU, C.B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemistry**, 33, 547-553, 1998.

YANG, Z. **Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties**. Dissertation Academic. Department of Food Technology, University of Helsinki, 15-32, 2000.

YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITO, H.; UEHARA, N.; FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Qué.: isolation and structure of a b-glucan. **Carbohydrate Research**, 140, 93-100, 1985.

YUAN, L.; WAGATSUMA, C.; YOSHIDA, M.; MIURA, T.; MUKODA, T.; FUJII, H.; SUN, B.; KIM, J-H; SURH, Y-J. Inhibition of human breast cancer growth by GCPTM (genistein combined polysaccharide) in xenogeneic athymic mice: involvement of genistein biotransformation by β -glucuronidase from tumor tissues. **Mutation Research**, 523-524, p. 55-62, 2003.

YOUNG, C.; GEAN, P. W.; WU, S. P.; LIN, C. H.; SHEN, Y. Z. Cancellation of low frequency stimulation-induced long-term depression by decosahexaenoic acid in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 247, p. 198-200, 1998.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharide from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, 18, 4-19, 2007.

ZHANG, H.; LIN, Z. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Pharmacol. Sin.**, 25, 2, 191-195, 2004.

